



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
2007

**Juliana Rodrigues  
Gadelha**

**Estudos Ecológicos Preliminares e Caracterização  
Química dos Cnidaria da Costa Noroeste Portuguesa**





**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
2007

**Juliana Rodrigues  
Gadelha**

**Estudos Ecológicos Preliminares e Caracterização  
Química dos Cnidaria da Costa Noroeste Portuguesa**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia, Biodiversidade e Gestão de Ecossistemas, realizada sob a orientação científica do Dr. Fernando Morgado, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Madalena Humanes, professora Auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Ciências de Lisboa.





Dedico este trabalho ao meu Fê e ao meu filho lindo.

“ As grandes Almas têm vontades, as mais fracas somente desejos”

“ Só existe um lugar onde o sucesso vem antes do trabalho, é no dicionário” Albert Einstein

## **O júri**

### **Presidente**

Prof. Dr. Amadeu Mortagua Velho da Maia Soares

Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Fernando Manuel Raposo Morgado

Professor Auxiliar com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Madalena Ramos de Lemos Araújo Humanes

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Ciências de Lisboa

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Maria das Candeias Guilhermino

Professora Catedrática do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto/ Laboratório de Ecotoxicologia do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR)





## **Agradecimentos**

Agradeço a todos que estiveram direta e indiretamente envolvidos na realização deste trabalho. Agradeço em primeiro lugar à minha “BIG” família que estão de longe a torcer por mim, a minha “mini” nova família Portuguesa com certeza (D. Fátima, S. Alberto, Rui Guilherme, Bruno, Antoninho, Zélia)! Pelo apoio oferecido, amor e compreensão pelas minhas ausências pelo trabalho, ao meu filho lindo. Gostaria de expressar toda gratidão aos que fizeram parte deste longo caminho rumo ao sucesso, a todos que participaram: à escola de mergulho Haliotis, aos técnicos do Departamento de Biologia (pela forçinha), aos funcionários do departamento (bar e secretaria) pela simpatia e gentileza. Ao pessoal do LABECO, sem excepção! Um muito obrigado aos professores que me ensinaram, sobretudo, a viver e crescer com dignidade: a profª Drª, ou simplesmente Madalena Humanes, como ela mesma faz questão, pela amizade e amabilidade prestada a mim, nas minhas maratonas relâmpago em Lisboa e também à Cusca Maria. E também agradeço a profª Drª Susana Santos, por me ter recebido com paciência no mundo da “Química Orgânica”...Um muito obrigada à profª Drª Lúcia Guilhermino pelo intercâmbio científico de primeira qualidade e também pela gentileza em ceder seu melhor aprendiz: Msc Luíz Vieira (Já Drº), para juntos produzirem ciência competitiva. Agradeço também ao Director do Deptº de Biologia, prof. Dr.Amadeu Soares, por acreditar no “nosso” trabalho e pelo voto de confiança. E é claro, como não poderia deixar de ser, o último e mais sentido agradecimento vai para o meu amigo, colega de profissão, companheiro de todas as horas, orientador da tese e da minha vida, o meu Fê! Muito obrigada por tudo. Mas não pensem que acabou, eu ainda cá estarei pra o ano a fazer, se Deus quiser e assim permitir, o Doutorado. Um aviso, se por acaso, acharem o início da minha tese um pouco, diferente do final, a explicação é: “Durante este ano, a viver longe do meu país, dos meus queridos familiares e amigos, sinto-me a sobreviver na selva, aprendendo a ser mulher, mãe e profissional....esta tese retrata um pouco do meu amadurecimento humano e espiritual”. Obrigada.

Juliana Rodrigues Gadelha

## ÍNDICE

	1
PALAVRAS-CHAVE	
RESUMO	2
KEY-WORDS	4
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS	6
	9
<b>PARTE A: ESTUDOS ECOLÓGICOS PRELIMINARES DE COLONIZAÇÃO EM SUBSTRATOS ARTIFICIAIS (ILHAS BERLENGAS, PORTUGAL)</b>	
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
ESTUDO DA ÁREA	12
TRABALHO DE CAMPO	12
TRABALHO DE LABORATÓRIO	12
TRATAMENTO DOS DADOS	13
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	14
CONCLUSÃO	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
	32
<b>PARTE B: CARACTERIZAÇÃO DOS CNIDÁRIOS DA COSTA PORTUGUESA</b>	
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS	34
DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DE CNIDÁRIOS DAS ILHAS BERLENGAS	34
DISCUSSÃO	35
POSIÇÃO SISTEMÁTICA DAS ESPÉCIES DE CNIDÁRIOS ENCONTRADOS NA COSTA PORTUGUESA	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	44
<b>PARTE C: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE CNIDÁRIOS DA COSTA NOROESTE PORTUGUESA</b>	
<b>ANEXO I: CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR E BIOQUÍMICA DOS COMPOSTOS</b>	
<b><i>EXTRAÍDOS DE ANEMONIA SULCATA (CNIDARIA) DA COSTA NOROESTE ATLÂNTICA (PORTUGAL)</i></b>	
	45
RESUMO	
PALAVRAS-CHAVES	46
ABSTRACT	46
KEY-WORDS	46
INTRODUÇÃO	47
MATERIAL E MÉTODOS	48
ESPÉCIE ESTUDADA	48
ÁREA DE ESTUDOS	49

LOCAL DE AMOSTRAGEM NORTE	49
LOCAL DE AMOSTRAGEM CENTRO	50
LOCAL DE AMOSTRAGEM SUL	50
LOCAL DE AMOSTRAGEM INSULAR	50
TRABALHO LABORATORIAL	51
TÉCNICAS UTILIZADAS	51
PRÉ-PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS (EXTRACÇÃO)	51
CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA	52
INFRAVERMELHO	52
RESULTADOS	52
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ESTUDO TAXONÓMICO E ECOLÓGICO DA ESPÉCIE <i>ANEMONIA SULCATA</i>	72
	73

## **ANEXO II: DETECÇÃO DA ACTIVIDADE DAS COLINESTERASES COMO BIOMARCADORES AMBIENTAIS EM *ANEMONIA SULCATA* (FORSKÅL, 1775) NA COSTA PORTUGUESA**

RESUMO	73
PALAVRAS-CHAVES	74
ABSTRACT	74
KEY-WORDS	75
INTRODUÇÃO	75
MATERIAL E MÉTODOS	76
PREPARAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO	77
QUANTIFICAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA	77
ANÁLISE ESTATÍSTICA	78
RESULTADOS	78
ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	78
DISCUSSÃO	79
CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
	85

## **ANEXO III: GLUTADIONA S-TRANSFERASES PODERÁ SER UM BIOMARCADOR AMBIENTAL NA ANÉMONA-DO-MAR *ANEMONIA SULCATA*, (FORSKÅL, 1775)?**

RESUMO	85
PALAVRAS-CHAVES	86
ABSTRACT	86
KEY-WORDS	87
INTRODUÇÃO	87
MATERIAL E MÉTODOS	88
PREPARAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO	88
QUANTIFICAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA	89
ANÁLISE ESTATÍSTICA	89
RESULTADOS	89
DISCUSSÃO	90
CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

# ÍNDICE DAS FIGURAS

9

## PARTE A: : ESTUDOS ECOLÓGICOS PRELIMINARES DE COLONIZAÇÃO EM SUBSTRACTOS ARTIFICIAIS (ILHAS BERLENGAS, PORTUGAL)

FIGURA 1: Distância das Ilhas Berlengas à Peniche (8,03 milhas). Localização com coordenadas Peniche lat=39.359019, lon=-9.377942	17
FIGURA 2: Localização da área de amostragem Cova do sonho lat 39°24'36.47"N, Lon 9°30'48.42"O elev 0 metros	17
FIGURA 3: Área escolhida para amostragens, situada na Berlenga grande, Cova do Sonho	18
FIGURA 4: Colonização sazonal dos substratos mole e duro (Natural e artificial) da área de amostragem Cova do Sonho (Ilhas Berlengas)	21
FIGURA 5 A E B: Comparação da temperatura máxima da água do mar (°C) em 1961-90 e 2007	22
FIGURA 6 A E B: Comparação da temperatura média do ar (°C) em 1961-90 e 2007	23
FIGURA 7 A E B: Comparação da quantidade média de precipitação (mm) em 1961-90 e 2007	24
	32

## PARTE B: CARACTERIZAÇÃO DOS CNIDÁRIOS DA COSTA PORTUGUESA

FIGURA 1: Representação Geográfica da área de Amostragem fotografada, Arquipélago das Berlengas: Berlenga grande, Estelas e Farilhões-Forçadas	36
FIGURA 2: Espécies de cnidários identificados nas Ilhas Berlengas: 1- <i>Eunicella verrucosa</i> (Pallas, 1766), 2- <i>Actinothoe sphyrodeta</i> (Gosse, 1858), 3- <i>Corynactis viridis</i> (Allman, 1846), 4- <i>Alcyonium glomeratum</i> (Hassal, 1843), 5- <i>Parazoanthus axinellae</i> (Schmidt, 1862), 6- <i>Leptosammia pruvoti</i> (Lacaze-Duthiers, 1897), 7- <i>Cerianthus membranaceus</i> (Spallanzani, 1784), 8- <i>Paramuricea clavata</i> (Risso, 1826), 9- <i>Anemonia viridis</i> (Forskål, 1775), 10- <i>Aiptasia mutabilis</i> (Gravenhorst, 1831), 11- <i>Actinia equina</i> (Linnaeus, 1758) e 12- <i>Leptogorgia sarmentosa</i> (Esper, 1789)	38
FIGURA 3: Distribuição Geográfica das espécies do Phylum Cnidaria encontradas nas Ilhas Berlengas	39
	44

## PARTE C: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE CNIDÁRIOS DA COSTA NOROESTE PORTUGUESA

ANEXO I: CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR E BIOQUÍMICA DOS COMPOSTOS	45
<i>EXTRAÍDOS DE Anemonia sulcata (CNIDARIA) DA COSTA NOROESTE ATLÂNTICA (PORTUGAL)</i>	60
FIGURA 1: Espécie utilizada para os testes de extracção química <i>Anemonia viridis</i> = <i>A. sulcata</i> (Forskål, 1775)	60
FIGURA 2: Áreas de Amostragem Norte(Viana do Castelo, Aguda), Centro (Estoril) e Sul (Sagres)	61
FIGURA 3: Localização geográfica espacial da Praia de Viana do Castelo (Praia Abrigada)	61
FIGURA 4: Praia de Viana do Castelo (Ponto de Amostragem 1- Costa Norte de Portugal)	61
FIGURA 5: Localização geográfica espacial da Praia da Aguda (Porto), costa norte Portuguesa	62
FIGURA 6: Praia da Aguda (Ponto 2-Costa Norte de Portugal)	62



FIGURA 7: Localização geográfica espacial da Praia de São Pedro do Estoril (costa centro Portuguesa) 63

FIGURA 8: Praia de São Pedro do Estoril, ponto amostragem da costa centro de Portugal 63

FIGURA 9: Localização geográfica espacial da Praia do Tonel- costa sul Portuguesa 64

FIGURA 10: Praia do Tonel (Sagres) ponto de amostragem Sul da costa Portuguesa 64

FIGURA 11: Localização geográfica espacial da Cova do Sonho, ponto insular da Costa Portuguesa 65

FIGURA 12: Cova do Sonho (Ilhas Berlengas) ponto de amostragem insular da costa Portuguesa 65

FIGURA 13: Número de elementos revelados pela cromatografia de camada fina em extratos de *Anemonia sulcata*, em diferentes concentrações de Hexano/Acetato de Etil (Ilhas Berlengas) 67

FIGURA 14: Número de elementos revelados pela cromatografia de camada fina em extratos de *Anemonia sulcata*, em diferentes concentrações de Hexano/Acetato de Etil (Viana do Castelo) 67

FIGURA 15: Número de elementos revelados pela cromatografia de camada fina em extratos de *Anemonia sulcata*, em diferentes concentrações de Hexano/Acetato de Etil (Aguda) 68

FIGURA 16: Número de elementos revelados pela cromatografia de camada fina em extratos de *Anemonia sulcata*, em diferentes concentrações de Hexano/Acetato de Etil (Estoril) 68

FIGURA 17: Número de elementos revelados pela cromatografia de camada fina em extratos de *Anemonia sulcata*, em diferentes concentrações de Hexano/Acetato de Etil (Sagres) 69

FIGURA 18: Infravermelho do extrato de *Anemonia sulcata* do ponto de Amostragem insular Ilhas Berlengas 70

FIGURA 19: Infravermelho do extrato de *Anemonia sulcata* do ponto de Amostragem Norte Aguda 70

FIGURA 20: Infravermelho do extrato de *Anemonia sulcata* do ponto de Amostragem Centro Estoril 71

FIGURA 21: Infravermelho do extrato de *Anemonia sulcata* do ponto de Amostragem Sul Sagres 71

73

## ANEXO II: DETECÇÃO DA ACTIVIDADE DAS COLINESTERASES COMO BIOMARCADORES AMBIENTAIS EM *Anemonia sulcata* (Forskål, 1775) NA COSTA PORTUGUESA

FIGURA 1: Espécie-alvo Anémoma-do-mar *Anemonia sulcata* (Forskål, 1775) 83

FIGURA 2: Áreas de Amostragem Norte e Sul da Costa Portuguesa (Norte- Viana do Castelo, Aguda e Sul- Sagres) 83

FIGURA 3: Parâmetros bioquímicos analisados em amostras de *Anemonia sulcata* coletadas de 3 áreas de amostragens ao longo da costa Portuguesa. São apresentados valores médios  $\pm$  desvio padrão ( $n = 7$ ) da actividade de ChE ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ ). Letras diferentes identificam diferenças significativas entre locais de amostragem, através do teste Tukey (honestly significant difference multiple-comparison test  $p \leq 0.05$ ). Letras minúsculas indicaram diferenças nos tecidos do tentáculo (a,b) e letras maiúsculas indicaram diferenças no pedúnculo (A, B) 84

85

## ANEXO III: GLUTADIONA S-TRANSFERASES PODERÁ SER UM BIOMARCADOR AMBIENTAL na Anémoma-do-mar *Anemonia sulcata*, (Forskål, 1775)?

FIGURA 1: *Anemonia sulcata* espécie escolhida para o estudo da actividades da GST (Glutathione S-transferase) 94

FIGURA 2: Áreas de amostragem da Costa Portuguesa (Norte- Praia de Viana do Castelo; Intermédia- Praia da Aguda; Sul- Praia do Tonel, Sagres.) 94

FIGURA 3: Parâmetros bioquímicos analisados em amostras de *Anemonia sulcata* coletadas de 3 áreas de amostragens ao longo da costa Portuguesa. São apresentados valores médios  $\pm$  desvio padrão (n = 7) da actividade de GST ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ ). Letras diferentes identificam diferenças significativas entre locais de amostragem, através do teste Tukey (honestly significant difference multiple-comparison test  $p \leq 0.05$ ). Letras minúsculas indicaram diferenças nos tecidos do tentáculo (a,b,c) e letras maiúsculas indicaram diferenças no pedúnculo (A, B,C) 95

# ÍNDICE DAS TABELAS

9

## PARTE A: : ESTUDOS ECOLÓGICOS PRELIMINARES DE COLONIZAÇÃO EM SUBSTRACTOS ARTIFICIAIS (ILHAS BERLENGAS, PORTUGAL)

TABELA 1: Parâmetros físico-químicos da água, de Junho a Dezembro na área de amostragem Cova do Sonho, Ilhas Berlengas- Portugal 19

TABELA 2: Colonização dos substratos mole, duro, natural e artificial de Junho a Dezembro, na Cova do Sonho, Ilhas Berlengas, Portugal 20

32

## PARTE B: CARACTERIZAÇÃO DOS CNIDÁRIOS DA COSTA PORTUGUESA

TABELA 1: Lista de filós fotografados nas Ilhas Berlengas 37

44

## PARTE C: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE CNIDÁRIOS DA COSTA NOROESTE PORTUGUESA

### ANEXO I: CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR E BIOQUÍMICA DOS COMPOSTOS 45

#### *EXTRAÍDOS DE Anemonia sulcata (CNIDARIA) DA COSTA NOROESTE ATLÂNTICA (PORTUGAL)*

66

TABELA 1: Resultados da cromatografia de camada fina, quantificação do número de compostos encontrados em diferentes concentrações de hexano para os extratos de éter de *Anemonia sulcata*

**Palavras-Chave**

Cnidários, Colonização de Substratos, Distribuição Geográfica, Extração Química, Biomarcadores Ambientais, *Anemonia sulcata*

## RESUMO

O levantamento de recursos em espécies marinhas em Portugal ainda é incipiente, considerando que este domínio de investigação tem sido amplamente desenvolvido noutros pontos do globo, pescas, química, bioquímica e farmacologia de organismos marinhos, de modo a obter informações sobre a química de produtos naturais e ecologia química de organismos marinhos derivadas destes organismos. São de realçar a importância das defesas químicas para as relações ecológicas de predação, competição por espaço e bioinvasão e suas implicações na distribuição dos organismos e estruturação de comunidades bênticas marinhas. Os trabalhos de investigação desta tese foram realizados em parte na Reserva Natural das Ilhas Berlengas e também ao longo de toda a costa Portuguesa. A investigação desenvolvida nas Ilhas Berlengas teve como objectivos principais efectuar estudos ecológicos preliminares de colonização em substratos artificiais e, por outro lado, o de efectuar uma caracterização preliminar dos cnidários. Os estudos efectuados ao longo da costa Portuguesa procuraram, por um lado, contribuir para a obtenção de informações sobre a química de produtos naturais e ecologia química de organismos marinhos, temas importantes e ainda pouco explorados no estudo de ecologia marinha, através do isolamento, elucidação estrutural e avaliação da actividade ecológica das substâncias obtidas de invertebrados marinhos. Por outro lado, pretenderam desenvolver e validar a metodologia necessária à utilização de *Anemonia sulcata* como organismo indicador em estudos de biomonitorização e ensaios laboratoriais. Nos estudos ecológicos preliminares de colonização em substratos artificiais os resultados mostraram que houve a colonização dos dois tipos de substratos mole e duro, artificial e natural, havendo diferenças quantitativas na biomassa de colonização. Porém, não foram encontrados abundâncias assinaláveis nem em termos de densidade e nem em termos de diversidade. O que pode ser explicado pela sensibilidade destes animais às alterações climáticas, quanto ao sua colonização, crescimento e dispersão. Podendo ter havido também influência da sazonalidade no povoamento dos substratos, já que os anos de 2006 e 2007 foram caracteristicamente atípicos, quanto às condições climáticas de temperatura atmosféricas, temperatura da água e níveis de precipitação, tendo sido encontrada variação destes valores entre dados de 1961-90 e 2007. A caracterização dos cnidários das Ilhas Berlengas revelou que as espécies de cnidários encontrados nas Ilhas Berlengas, correspondem à maioria das encontradas em toda a costa. Sendo estas espécies de origem Nórdica, Ilhas Britânicas, Mediterrânicas, costa Noroeste da África e ocorrem também nos Açores e Canárias. Foram encontradas as seguintes espécies do Phylum Cnidaria: *Eunicella verrucosa* (Pallas, 1766), *Actinothoe sphyrodeta* (Gosse, 1858), *Corynactis viridis* (Allman, 1846), *Alcyonium glomeratum* (Hassal, 1843), *Parazoanthus axinellae* (Schmidt, 1862), *Leptosammia pruvoti* (Lacaze-Duthiers, 1897), *Cerianthus membranaceus* (Spallanzani, 1784), *Paramuricea clavata* (Risso, 1826), *Anemonia viridis* (Forsk. , 1775), *Aiptasia mutabilis* (Gravenhorst, 1831), *Actinia equina* (Linnaeus, 1758). Na caracterização química de *Anemonia sulcata* da costa noroeste português, a cromatografia de camada fina, revelou que o extrato de *Anemonia sulcata* é complexo, ou seja, possui vários compostos. Foram identificadas manchas com diferentes pesos moleculares, como substâncias de pigmentação, clorofila, carotenóides, esteróides. O trabalho realizado constituiu apenas uma abordagem preliminar que envolveu, apesar disso, toda a costa Portuguesa, tendo-se centrado a atenção apenas na análise da composição química elementar de *Anemonia sulcata*. Face aos interessantes resultados obtidos será aconselhável a realização de trabalhos futuros com um grau de abordagem mais específico.

Na caracterização enzimática de *Anemonia sulcata* da costa noroeste português verificou-se que foi observada actividade significativa da CHE tanto no tentaculo como no pedúnculo, mas não foram observadas diferenças significativas entre tentaculo e pedúnculo. A actividade das colinesterases de *Anemonia sulcata* foi significativamente diferente nos três locais de amostragem. Foi também observada actividade significativa de GST no tentaculo e no pedúnculo, mas não foram observadas diferenças significativas entre tentaculo e pedúnculo. A actividade da GST de *Anemonia sulcata* da praia de Sagres, situada no sul da costa Português foi significativamente diferente

dos outros dois locais de amostragem (Praia de Aguda e Viana do Castelo), situados no centro e norte da costa Portuguesa, respectivamente. Os resultados revelaram que *Anemonia sulcata* é uma espécie sensível e adequado para funcionar como um bioindicador e válida para os futuros estudos ecotoxicológicos laboratoriais.

**keywords**

Cnidarians, Substrata Colonization, Geographical Distribution, Chemical Extraction, Environmental Biomarkers, *Anemonia sulcata*

## ABSTRACT

The survey of resources in marine species in Portugal is still incipient, considering that this domain of inquiry has been widely developed in other places of the globe, fisheries, chemistry, biochemist and pharmacology of marine organisms, in order to get information on the chemistry of natural products and chemical ecology of marine organisms derived from these organisms. They are to enhance the importance of the chemical defenses for the ecological relations of predation, competition for space and bioinvasion and its implications in the distribution of the organisms and structuring the benthic communities. The work developed in this thesis had been carried out in the Natural Reserve of the Berlengas Islands and also throughout the Portuguese coast. In the Berlengas Islands the main objectives are to effect preliminary ecological studies of settling in artificial substrata and, on the other hand, to effect a preliminary characterization of the Cnidaria. The studies carried out in the Portuguese coast had looked to contribute for the attainment of information on the chemistry of natural products and chemical ecology of marine organisms, important subjects and still little explored in the study of marine ecology, through the isolation, structural briefing and evaluation of the ecological activity of substances obtained from marine invertebrates. On the other hand, they had intended to develop and to validate the necessary methodology to the use of *Anemonia sulcata* as indicating organism in biomonitorization studies and laboratorial assays. In the preliminary ecological studies of settling in artificial substrata the results had shown that it had the settling of the two types of substrata, soft and hard, artificial and natural, showing quantitative differences in the settling biomass. However, quantitative results had not been found designated nor in terms of density and nor in terms of diversity. The result may be analyzed in terms of the sensibility of these animals to the climatic alterations, influencing its settling, growth and dispersion. The characterization of the Cnidaria of the Berlengas Islands disclosed that the species found correspond to the majority of the Portuguese coast. The identified species were also described on British Scandinavian, Islands, Mediterrânicas, coast the Northwest of Africa and they also occur in the Açores and the Canaries. The following species of the Phylum Cnidaria had been found: *Eunicella verrucosa* (Pallas, 1766), *Actinothoe sphyrodeta* (Gosse, 1858), *Corynactis viridis* (Allman, 1846), *Alcyonium glomeratum* (Hassal, 1843), *Parazoanthus axinellae* (Schmidt, 1862), *Leptosammia pruvoti* (Lacaze-Duthiers, 1897), *Cerianthus membranaceus* (Spallanzani, 1784), *Paramuricea clavata* (Risso, 1826), *Anemonia viridis* (Forskål, 1775), *Aiptasia mutabilis* (Gravenhorst, 1831), *Actinia equina* (Linnaeus, 1758). In the chemical characterization of *Anemonia sulcata* of the northwest Portuguese coast, the chromatography of fine layer, it disclosed that the extract of *Anemonia sulcata* is complex, or either, possess some composites. Spots with different molecular weights had been identified, as substances of pigmentation, chlorophyll, carotenoids and esteroids. The work carried out constituted only one preliminary boarding that involved, despite this, the Portuguese coast, having itself centered the attention only in the analysis of the elementary chemical composition of *Anemonia sulcata*. Due to the interesting results obtained will be advisable the accomplishment of future works with a more specific approach. In the enzymatic characterization of *Anemonia sulcata* of the northwest Portuguese coast it was verified CHe significant activity in tentacle and peduncle, but had not been observed significant differences between them. The activity of cholinesterase's of *Anemonia sulcata* was significantly different in the three sampling places. Also significant GST activity of GST was observed in tentacle and peduncle, but had not been observed significant differences between them. The GST activity of *Anemonia sulcata* of the beach of Sagres, situated in the south of the Portuguese coast was significantly different of the others two places of sampling (Viana do Castelo and Praia da Aguda), situated in the center and north of the Portuguese coast, respectively. The results are indicative that *Anemonia sulcata* is a sensible species and adjusted to function as a valid bioindicator and for future laboratorial ecotoxicological studies.



## INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS

Devido à sua enorme biodiversidade o ambiente marinho tem papel importante a desempenhar para o desenvolvimento de novas áreas de investigação acerca dos recursos marinhos, e abordagens inovadoras de aproveitamento dos recursos biológicos nas 200 milhas da Zona Económica Exclusiva de nossa costa marítima inserem-se de forma marcante neste contexto mais amplo. O levantamento de recursos em espécies marinhas em Portugal ainda é incipiente, considerando que este domínio de investigação tem sido amplamente desenvolvido noutros pontos do globo, pescas, química, bioquímica e farmacologia de organismos marinhos, de modo a obter informações sobre a química de produtos naturais e ecologia química de organismos marinhos derivadas destes organismos, nomeadamente a importância das defesas químicas para as relações ecológicas de predação, competição por espaço e bioinvasão e suas implicações na distribuição dos organismos e estruturação de comunidades bênticas marinhas.

Nos últimos vinte anos, muitos estudos têm sido realizados com o intuito de desvendar a origem de metabolitos em corais, algas, esponjas, ascídeas, briozoários e moluscos (Coll, 1992) (Rama Rao *et al.*, 2000). Muitos metabolitos secundários possuem propriedades bioactivas na farmacologia (citotóxica) (Duh *et al.*, 1999, 2000) (Duh *et al.*, 1999) ou na ecologia (ictiotóxica ou alelopática) (Sammarco *et al.*, 1985; Sammarco & Coll, 1992; Coll, 1992). (Handayani *et al.*, 1997). Certos organismos têm evidenciado um elevado conteúdo em metabolitos secundários que expressam as mais diversas funções ecológicas, actuando como defesa antipredação (e.g. Gerhart, 1986; Bakus & Thun, 1979; Coll *et al.*, 1982a; Sammarco & Coll, 1988), agente alelopático (e.g. Wahle, 1980; Sammarco *et al.*, 1987; La Barre *et al.*, 1986a; Dai, 1990; Alino *et al.*, 1992b; Coll, 1992; Fleury, 1999; Fleury *et al.*, 2000), antiincrustação (Ciereszko *et al.*, 1973; Bakus *et al.*, 1986; Rittschof, 2001, para revisão) e de atracção sexual (e.g. Bowden *et al.*, 1985; Coll *et al.*, 1986, 1989, 1990; Wallace *et al.*, 1986; Alino & Coll, 1989; Coll, 1992) (Pawlik, 1993). A química de produtos naturais marinhos constitui um ramo da química de produtos naturais que atingiu excelência a partir dos anos 80.

Por outro lado, os bioindicadores, organismos que, quer pela sua presença, ausência ou comportamento, nos dão informações sobre as condições ambientais do seu habitat, têm vindo a ser consistentemente utilizados para extrapolar efeitos dos contaminantes no meio ambiente (Van Gestel & Van Brummelen, 1996). Os cnidários ocupam vastas áreas de preservação ecológica da costa Portuguesa pelo que conhecer sua ecologia e os padrões que regulam suas populações são importantes informações geradas para a gestão das espécies. Este entendimento serve de base para que estudos de crescimento, colonização e povoamento que forneçam ferramentas para a gestão ambiental no ecossistemas marinhos e sejam direccionados no sentido de alcançar um equilíbrio sustentável do ambiente. Os cnidários são animais que estão na base trófica dos ecossistemas na maioria, filtradores e alguns predadores que necessitaram de adaptações para alimentação e defesa, sendo produtores de substâncias urticantes e apresentam muitas vezes cores vibrantes ou investem em camuflagens, sendo também simbióticos muito elaborados. Estes aspectos fazem salientar a importância de compreender o funcionamento e os mecanismos de sobrevivência e colonização destes organismos. A anémona-do-mar *Anemonia sulcata*, apresenta uma extensa distribuição ao longo da costa Portuguesa e desempenha um importante papel ecológico na cadeia trófica marinha o que realça a importância da sua utilização para estudos ecológicos e ecotoxicológicos como bioindicador ou biomonitor tanto em estudos de campo como de laboratório.

Recentemente, têm vindo a ser utilizados, quer em estudos laboratoriais quer em estudos de campo, parâmetros sub-individuais como critérios indicativos de toxicidade, vulgarmente conhecidos como biomarcadores (Stegeman et al., 1992). Os biomarcadores têm sido utilizados em estudos de monitorização ambiental com o intuito de diagnosticar a exposição de populações naturais a contaminantes, tendo em consideração variações temporais, comparar locais com diferentes tipos de contaminação e, em alguns casos, estudar efeitos induzidos pela exposição a xenobióticos (Van der Oost & Vermeulen, 2003). O uso simultâneo de diferentes biomarcadores dá um importante contributo para a avaliação dos efeitos que estão a ser induzidos em organismos expostos, bem como para a identificação do tipo de contaminantes presentes no meio (Mayer et al., 1992; Peakall, 1992).

Os trabalhos de investigação desta tese foram realizados em parte na Reserva Natural das Ilhas Berlengas e também ao longo de toda a costa Portuguesa. Os estudos científicos descritos para o ambiente marinho na Reserva Natural das Berlengas não têm sido muitos (Henriques, 1993; Rodrigues, 1993; Almeida, 1996; Azeiteiro *et al.*, 1997; Bengala *et al.*, 1997a; b; c; Metelo, 1999; Neto, 1999; Neto *et al.*, 1999). A investigação desenvolvida nas Ilhas Berlengas teve como objectivos principais efectuar estudos ecológicos preliminares de colonização em substratos artificiais e, por outro lado, o de efectuar uma caracterização preliminar dos cnidários. Os estudos efectuados ao longo da costa Portuguesa procuraram, por um lado, contribuir para a obtenção de informações sobre a química de produtos naturais e ecologia química de organismos marinhos, temas importantes e ainda pouco explorados no estudo de ecologia marinha, através do isolamento, elucidação estrutural e avaliação da actividade ecológica das substâncias obtidas de invertebrados marinhos. Por outro lado, pretenderam desenvolver e validar a metodologia necessária à utilização de *Anemonia sulcata* como organismo indicador em estudos de biomonitorização e ensaios laboratoriais.

PARTE A

**ESTUDOS ECOLÓGICOS PRELIMINARES DE COLONIZAÇÃO EM  
SUBTRACTOS ARTIFICIAIS (ILHAS BERLENGAS, PORTUGAL)**

## INTRODUÇÃO

Estudos ecológicos são utilizados para estabelecer bases científicas, através de ferramentas diversas, para tentar compreender o funcionamento do ambiente ou de organismos. O presente trabalho realizou um estudo ecológico preliminar de colonização em substratos artificiais nas Ilhas Berlengas reconhecidas como local de grande relevância ecológica. Este trabalho procurou efectuar uma selecção de locais que possuissem elevada biodiversidade e que permitisse a selecção de grupos taxonómicos a utilizar para estudos de colonização de substratos artificiais. A análise dos factores ambientais, tais como corrente, temperatura da água, luminosidade, precipitação, nutrientes e outros elementos presentes na água associados a factores de interferência naturais e de fauna associada foram também considerados. Estudos de sucessão fornecem informações sobre a dinâmica das comunidades (Foster, 1975), pois os padrões de recolonização serão consequência das adaptações fisiológicas das espécies, seus históricos de vida, padrões demográficos e interações inter e intra específicas (Dayton *et al.*, 1984; Sousa, 1980, 1984a; Steneck, 1986; Kendrick & Walker, 1994; Tanner *et al.*, 1994 Além disso, diversos estudos revelaram que diferentes atributos dos regimes de perturbações, como: tamanho, frequência, intensidade, localização, temporalidade ou sazonalidade, também têm grande influência na dinâmica da sucessão observada na comunidade (Foster, 1975; Emerson & Zedler, 1978; Sousa, 1979a, 1979b, 1980, 1984b, 1985; Turner, 1983; Farrell, 1989; Dye, 1993; Benedetti-Cecchi & Cinelli, 1993, 1994, 1996; Kim & DeWreed, 1996).

A escolha dos substratos para a realização deste estudo foi baseada em primeiro lugar, nos recursos e logística a que o projecto dispunha. Logo, os materiais utilizados visaram a construção de um protótipo feito com materiais simples de encontrar no mercado e de baixo custo e que não necessitasse de uma logística muito sofisticada, com relativa facilidade de manuseio em ambiente marinho e a exploração de outro tipo de materiais. Na região costeira as grandes mudanças ambientais são causadas devido à concentração das populações e desenvolvimento de actividades nos ecossistemas associados (CRAICK *et al* 1990). O ambiente do substrato rochoso associado à zona costeira, constitui um ecossistema de fundamental importância para cadeia alimentar marinha. Os cnidários ocupam vastas áreas nestes ecossistemas pelo que para a preservação ecológica da costa Portuguesa importa conhecer a sua ecologia e os padrões

que regulam suas populações, informações fundamentais para a gestão de todo o ecossistema costeiro. Este entendimento serve de base para que estudos de crescimento, colonização e povoamento que permitam alcançar um equilíbrio sustentável do ambiente. Estes estudos poderão contribuir com informações científicas importantes para a criação e viabilização futuras de construção de recifes artificiais, a fim de preservar espécies importantes para o funcionamento dos ecossistemas marinhos. A investigação desenvolvida neste trabalho teve como objectivo contribuir para a compreensão do papel dos organismos bentónicos no processo de colonização, predação e bioinvasão no ambiente marinho e compreender as suas implicações na distribuição dos organismos e sua estruturação no substrato rochoso costeiro. As hipóteses testadas no seguinte trabalho, foram: o tipo de material utilizado nos substratos influencia a sua colonização? A consistência do substrato (mole ou duro) influencia a colonização do mesmo? Haverá diferenças de colonização em cada tipo de substrato Artificial (com tinta) e Natural (sem tinta)? Haverá uma evolução na colonização sazonal dos substratos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Estudo da Área**

O arquipélago das Berlengas (Fig.1) é constituído por 3 grupos de ilhas: A Berlenga grande, Estelas e Farilhões-Forçadas. Este arquipélago encontra-se a 5,7 milhas de distância do Cabo Carvoeiro e a 8,03 milhas de distância de Peniche. A Berlenga grande ou simplesmente Berlenga mede 1500 metros de comprimento e 800 metros de largura com um perímetro aproximadamente 4 quilómetros, sendo o único ilhéu habitado. A parte mais considerável da ilha, situada a oeste, chama-se simplesmente "Berlenga" e compreende dois terços da superfície total da ilha, mais a leste e separada daquela por um estrangulamento resultante da erosão marítima sobre uma importante falha geofísica encontramos a Berlenga pequena. (ou "ilha velha"). A Berlenga Grande é acompanhada no arquipélago: pelas Estelas, 18 pequenos rochedos; pela Berlenga Pequena ou da Velha; pelas Forçadas, constituídas por recifes; As Berlengas beneficiam de dois tipos de influências climáticas: A Atlântica, nas áreas mais expostas a norte; a Mediterrânea, nas expostas a sul. Esta última caracteriza-se por dois períodos, um de aridez entre o fim da Primavera e o início do Outono e outro de intensas chuvas, no Inverno. O arquipélago também é condicionado pela influência dos

ventos, muito fortes nos alcantilados a norte e mais brandos do lado sul, ventos estes que afectam a distribuição de fauna e flora na ilha. Esta particularidade climática proporciona ao Arquipélago a existência de um ecossistema único, tanto a nível terrestre como marinho.

## **Trabalho de Campo**

A área de amostragem escolhida para este estudo foi a Cova do Sonho (39°24'36.47"N, 9°30'48.42"O) (Fig. 2 e Fig. 3), situada na parte sul das Ilhas Berlengas, de onde foram colectadas as amostras para identificação e também colocados os substratos naturais e artificiais. Foi realizada uma saída 0, para fazer o reconhecimento do local e a escolha do ponto de amostragem e realização dos ensaios de campo. Foram utilizadas 36 amostras sendo 18 tijolos e 18 esponjas, dentro das quais, 9 foram pintados com tinta e 9 sem tinta (substratos artificiais e naturais). Os substratos foram confeccionados utilizando esponja industrializada e tijolos, simulando substrato mole e duro respectivamente, os quais foram presos por uma cordas de 15 metros de comprimento de espessura de 0,5 mm. A amostragem foi do tipo não intrusiva, sendo os substratos fotografados de Junho a Dezembro de 2007 para acompanhar a evolução na colonização dos diferentes substratos e então quantificados através da área de ocupação.

Foram medidos os parâmetros físico-químicos da água em campo: temperatura, salinidade, pH e recolhidas amostras de água para análise em laboratório de nutrientes, entre os meses de Junho a Novembro (Tab.1).

## **Trabalho de Laboratório**

Foram efectuadas análises de nitritos, nitratos e fosfatos presentes na água através dos métodos NITRITO LR (Método 8507, reagente nitriver 3), NITRATO HR (Método 8039, reagente nitriver 5) e PHOSPHORUS REACTIVE (Método 8048, reagente phosver 3). Foram efectuadas recolhas bibliográficas de parâmetros meteorológicos e oceanográficos: temperatura atmosférica, temperatura da água, nebulosidade, direcção e força do vento, precipitação e humidade do ar.

## **Tratamento dos dados**

O tratamento dos dados foi feito através da contagem percentual de colonização dos substratos, com o apoio de um quadrado virtual o qual estabelecia a faixa colonizada versus área coberta.

## **RESULTADOS**

A análise qualitativa e quantitativa dos substratos foram efectuadas a partir da análise de fotografias tiradas mensalmente, de modo a acompanhar a evolução da colonização. A contagem foi efectuada individualmente em cada uma das amostras, através de percentagens de colonização (Tab. 2). Verificou-se que as algas vermelhas (*Asparagopsis armata*) apareceram em primeiro lugar na sucessão ecológica, colonizando os substratos, dominante em termos de percentagem de ocupação, sobretudo no substrato mole. Em seguida, apareceram nos substratos, sobretudo no duro, tubícolas (Fig. 4). De um modo geral, nos curtos seis meses de amostragem, houve colonização dos dois tipos de substratos mole e duro, artificial e natural, havendo diferenças quantitativas na biomassa de colonização. Porém, não foram encontrados abundâncias assinaláveis nem em termos de densidade e nem em termos de diversidade.

De modo a complementar a análise da colonização dos substratos foram aferidas condições meteorológicas climáticas da região da amostragem, durante o ano de 2006 e 2007, para serem avaliadas as condições e alterações de agentes forçadores tais como correntes, temperatura do ar, temperatura da água e precipitação (Instituto de Meteorologia (IP) de Portugal) os quais foram comparados com dados de anos anteriores (1961-90). Esta análise serviu para avaliar possíveis alterações, observando – se nos últimos dois anos alterações climáticas relevantes na costa Portuguesa (Figuras 5 a e b; 6 a e b e 7 a e b).



## DISCUSSÃO

O deficit de colonização dos substratos pode ser devido à factores sazonais de dispersão associados ao vento que, em especial durante o verão, sopra moderado de N ou NNW (regime de nortada) na faixa costeira de Portugal continental. Este facto é devido à acção conjunta do anticiclone dos Açores, da depressão de origem térmica (formada na península Ibérica) e da brisa marítima, causando um aumento do gradiente horizontal de pressão sobre esta região. Provocando um aumento da velocidade do vento, o que pode explicar a não fixação dos substratos, visto que a área de amostragem encontrava-se numa linha de congruência de correntes opostas e exposta.

Em ambientes marinhos bênticos, principalmente de substrato duro esses espaços são de extrema importância para organismos sésseis que requerem espaços vazios para sua fixação (Kim & DeWreede, 1996). Connell & Slatyer (1977) propõem que mecanismos de competição por recursos entre plantas ou animais sésseis são determinantes para o curso da sucessão. No caso de algas, as taxas de recrutamento e sobrevivência das espécies podem estar diretamente relacionadas a taxa de herbivoria (Underwood & Jerkanoff, 1981). A herbivoria pode controlar direta ou indiretamente o processo de recolonização do substrato, além de determinar a diversidade e a abundância da flora nas comunidades de costões rochosos (Steneck, 1982; Lubchenco, 1983; Duggins & Dethier, 1985; Menge *et al.*, 1985; Menge, 1991; Dye, 1993; McCook, 1996). Os padrões de distribuição das algas resultam de uma interação entre taxa de produção, taxa de herbivoria e taxa de competição (Lubchenco & Gaines, 1981). Algas pardas, de maneira geral, monopolizam o sublitoral raso de costões rochosos em regiões temperadas e frias (Bold & Wynne, 1978; Hawkins & Harkin, 1985; Luning, 1990) e em regiões tropicais (Paula, 1978; Eston *et al.*, 1986; Luning, 1990), podendo ser responsáveis por uma produtividade tão alta quanto, ou maior, que alguns dos mais produtivos sistemas terrestres (Mann, 1973, 1977). Ainda, a densa cobertura de suas plantas pode produzir uma barreira contra a fixação das células reprodutivas de outras macroalgas e de macroinvertebrados ou pode inibir seus crescimentos, pelo efeito de sombreamento e diminuição da temperatura (Ang, Jr., 1985b; Critchley *et al.*, 1990). (Fonseca, 1998).

As diferenças mensais verificadas poderão estar associadas ao padrão climático verificado nos últimos anos na costa Portuguesa. As condições

meteorológicas em Portugal continental são condicionadas essencialmente pelos factores permanentes, designadamente a latitude (região de transição entre a zona dos anticlones subtropicais e a zona de depressões subpolares do hemisfério norte), a orografia, a influência do oceano atlântico e a continentalidade. Junto à costa, a estes factores acresce a influência das orientações dominantes da linha de costa. A frente polar (que corresponde à zona de separações entre as massas de ar polar continental e as massas de ar tropical marítimo, à superfície) tem uma migração periódica anual para norte no verão e para sul durante o Inverno, atingindo nesta época Portugal continental e consequentemente, o território fica sob a influência das depressões frontais. No Inverno, predominam massas de ar marítimo e ventos de N ou NW associados. Por vezes, surgem situações com predomínio de vento de NE ou E, ar frio e seco, associados à circulação de um anticiclone continental (Anticiclone de bloqueio). O verão é caracterizado por uma situação meteorológica bastante estável, em que a região fica sob a influência conjunta da crista NE do anticiclone do Açores e da depressão térmica que se forma sobre a península Ibérica. O enquadramento geofísico associado ao regime de vento na costa origina fenómenos de afloramento costeiro (“upwelling”), caracterizado pela subida de águas frias junto à costa, que condicionam o clima na região. Os ventos predominantes na faixa costeira ocidental (da foz do Rio Minho ao cabo de São Vicente) sopram, em geral, de N e NW. No litoral sul (do cabo de Sagres à foz do Rio Guadiana) predominam ventos de SW. Segundo os dados do Instituto Meteorológico de Portugal (IP), os valores mais elevados da temperatura da água do mar à superfície ocorreu nos meses de Setembro e Outubro na costa ocidental e nos meses de Julho a Setembro na costa sul. Os valores mais baixos ocorreram de Dezembro a Março em toda costa. Segundo dados do IP, durante os anos de 1961 a 1990, os valores da temperatura média da água do mar em Peniche, aumenta de Janeiro a Abril e começa a diminuir no final de Julho. Nas regiões costeiras, a precipitação ocorre sob a forma de chuva, chuveiro, aguaceiros, granizo e muito raramente de neve. Fora as variações locais devidas ao efeito orográfico, a frequência e a quantidade média anual de precipitação na costa decresce de N para S (Figs. 7a e 7 b).

O ano de 2006 foi considerado como o 5º mais quente em Portugal desde 1931, sendo o Verão de 2006 o 5º mais quente, o Outono o 3º mais quente e o Inverno classificou-se como muito seco. A primavera também se caracterizou como muito seca, apesar de o mês de Março ter sido muito chuvoso, como consequência, a situação de seca, iniciada no final de 2004 e que acabou em 31 de Março de 2006. Portanto, a partir

de 2006, a costa Portuguesa vêm sofrendo alterações climáticas relevantes através de sucessivos fenómenos climáticos relevantes tais como, neve em Janeiro na região sul (litoral com baixa altitude); mais dias com temperaturas inferiores a 0 °C entre Janeiro e Fevereiro; ocorrência de ondas de calor de Maio a Setembro; forte onda de calor tanto espacial quanto temporal, com 11 dias consecutivos em Julho em sequência de noites quentes ( $\geq 20^{\circ}\text{C}$ ) e em Setembro, foram registadas máximas das temperaturas do ar. Em relação a precipitação, a registar que em Outubro houve a ocorrência de níveis máximos diários de chuva e em Novembro o valor diário ultrapassou o mensal na ocorrência de chuvas. Sendo encerrado o ano de 2006 em Dezembro com valores normais de temperatura, porém com alta amplitude entre a máxima e a mínima diária e em relação à precipitação, foi um mês considerado seco.

O período de amostragem foi caracterizado como extremamente seco e com valores médios de temperatura do ar inferiores aos índices normais ( $12,2^{\circ}\text{C}$  para o Cabo Carvoeiro). O clima foi condicionado pela influência de anticiclones vindos da costa Britânica, com ocorrência de frentes frias e geadas, nebulosidade em algumas regiões e um aumentou na nebulosidade com ocorrência de granizo, nevoeiro e neve em algumas regiões. Nos dias quentes, foram observados fortes ondas de calor com dias quentes e noites frias. Em Julho, foi registrado um aumento de  $0,5^{\circ}\text{C}$  no Cabo Carvoeiro, níveis elevados de precipitação, tendo sido considerado o mais chuvoso dos últimos 20 anos. Em Outubro, cerca de 2/3 do território encontra-se em situação de seca meteorológica fraca. Para além do escasso período de amostragem e das condições biológica naturais alguns destes aspectos podem ajudar a explicar o declínio na colonização dos substratos amostrados nas Berlengas em termos de abundância.

## CONCLUSÃO

Houve a colonização dos dois tipos de substratos mole e duro, artificial e natural, havendo diferenças quantitativas na biomassa de colonização. Porém, não foram encontrados abundâncias assinaláveis nem em termos de densidade e nem em termos de diversidade. O que pode ser explicado pela sensibilidade destes animais às alterações climáticas, quanto ao sua colonização, crescimento e dispersão. Podendo ter havido também influência da sazonalidade no povoamento dos substratos, já que os anos de 2006 e 2007 foram caracteristicamente atípicos, quanto às condições climáticas de temperatura atmosféricas, temperatura da água e níveis de precipitação, tendo sido encontrada variação destes valores entre dados de 1961-90 e 2007.



Figura 1: Distância das Ilhas Berlengas à Peniche (8,03 milhas). Localização com coordenadas Peniche lat=39.359019, lon=-9.377942.



Figura 2. Localização da área de amostragem Cova do sonho lat 39°24'36.47"N, Lon 9°30'48.42"O elev 0 metros.



Figura 3. Área escolhida para amostragens, situada na Berlenga grande, Cova do Sonho.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água, de Junho a Dezembro na área de amostragem Cova do Sonho, Ilhas Berlengas- Portugal.

Amostragem	Junho- Saída I 12/07/07	Julho- Saída II 2/08/07	Agosto Saída III 7/09/07	Setembro Saída IV 03/10/07	Outubro Saída V 14/11/07
Temperatura	17,8	18,0	19,0	17,0	18,0
Salinidade	33,25	35,2	34,9	35,1	35,5
pH	7,04	7,60	7,91	7,41	8,11
Nutrientes Nitritos (mg/l N NO <sub>2</sub> /L)	0.007	0.006	0,06	0,012	0,022
Nitratos mg/l N NO <sub>3</sub> /H	1,1	1,6	0,6	4,8	1,6
Fosfatos mg/l PO <sub>4</sub> <sup>3</sup> /PV	0,15	0,14	0,01	1,77	0,21

Tabela 2. Colonização dos substratos mole, duro, natural e artificial de Junho a Dezembro, na Cova do Sonho, Ilhas Berlengas, Portugal.

Amostragem	Nº de Amostras	Nº de Amostras Colonizadas	Nº de Substrato mole colonizados (Esponja)	Nº de Substrato duro colonizados (Tijolo)	Nº de Substrato Natural Colonizados (Sem tinta)	Nº de Substrato Artificial Colonizados (Com tinta)	Percentagem total de colonização
Saída I- Junho	36	Início					
Saída II- Julho	28	11	11	0	6	5	39,28%
Saída III- Agosto	36	28	13	15	6	22	77,77%
Saída IV- Setembro	22	15	8	7	4	11	68,18%
Saída V- Outubro	26	26	11	15	14	12	100%

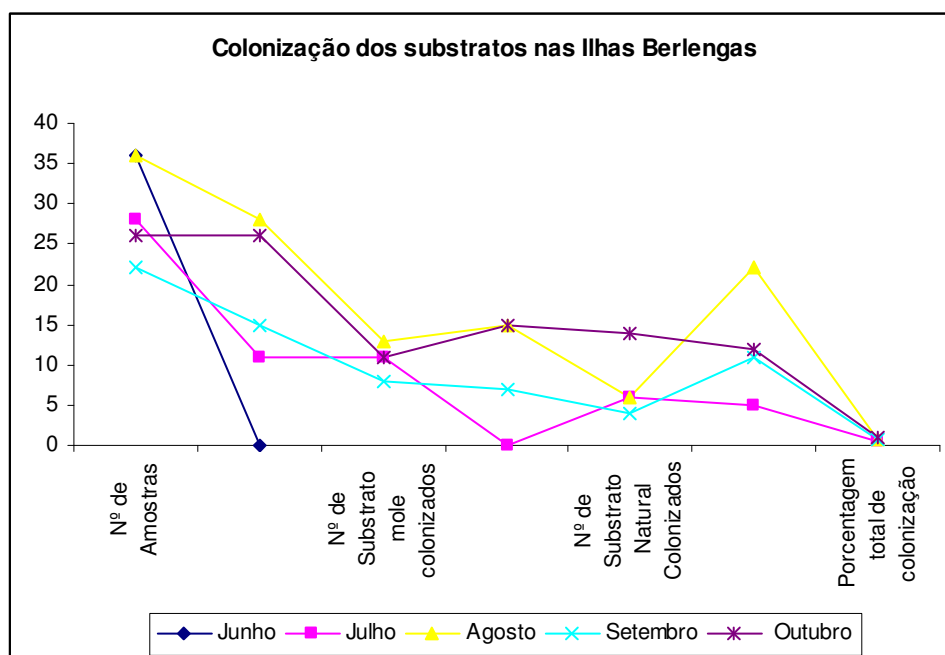


Figura 4. Colonização sazonal dos substratos mole e duro (Natural e artificial) da área de amostragem Cova do Sonho (Ilhas Berlengas).



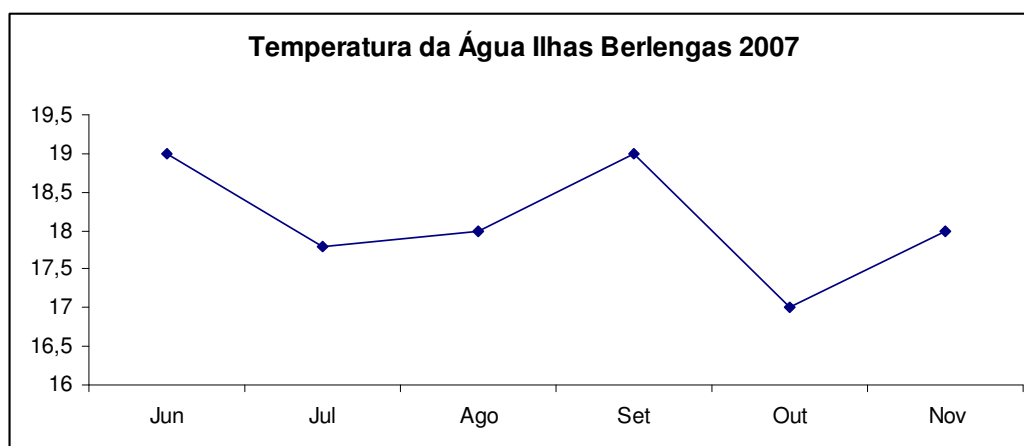
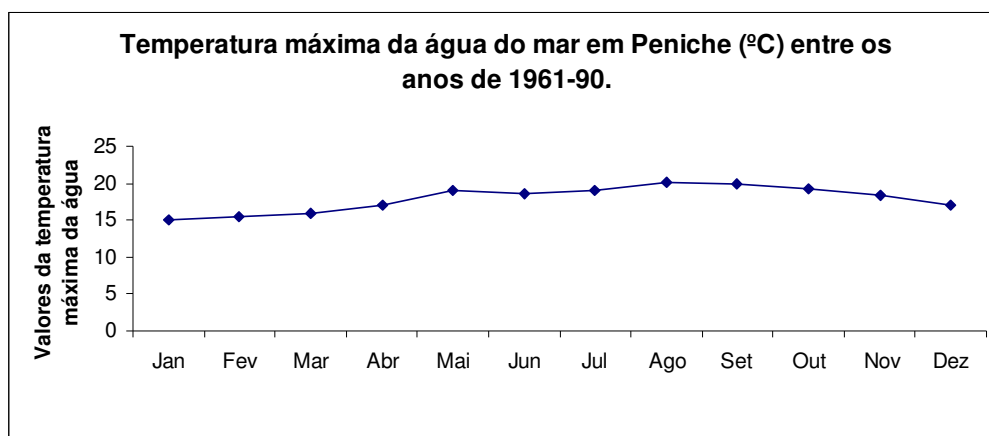


Figura 5 a e b: Comparação da temperatura máxima da água do mar (°C) em 1961-90 e 2007.

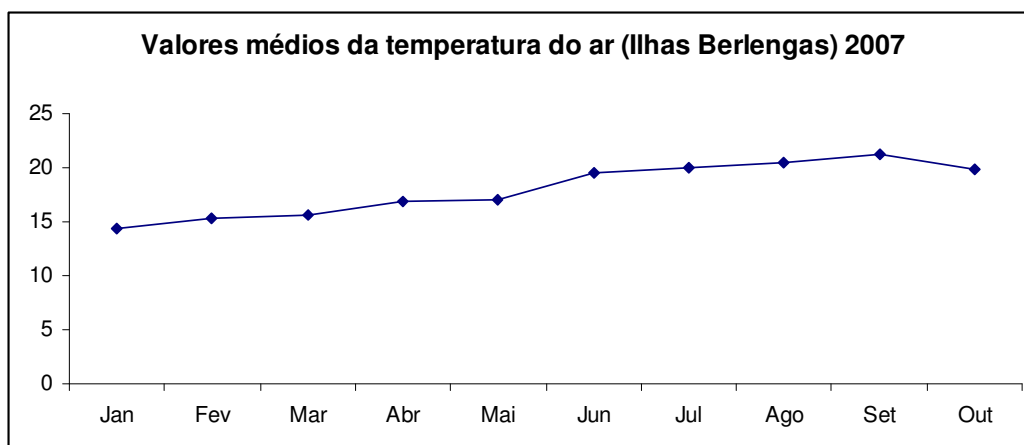
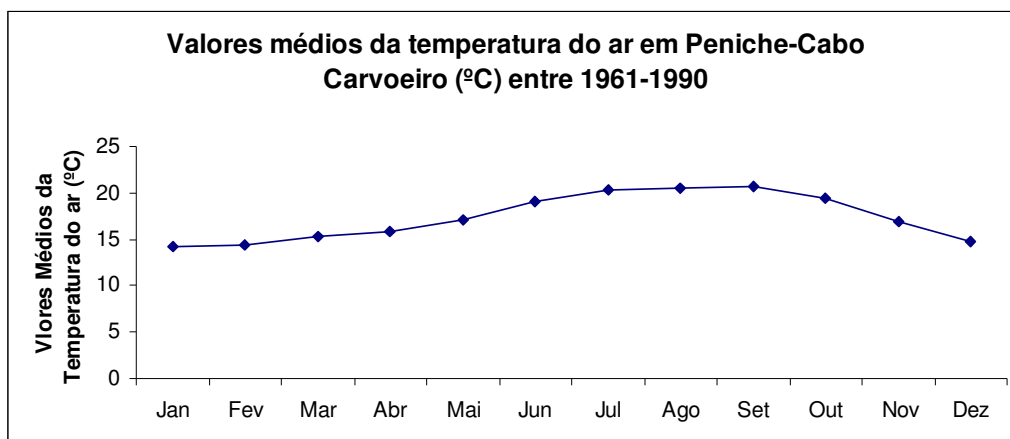


Figura 6 a e b: Comparação da temperatura média do ar (°C) em 1961-90 e 2007.

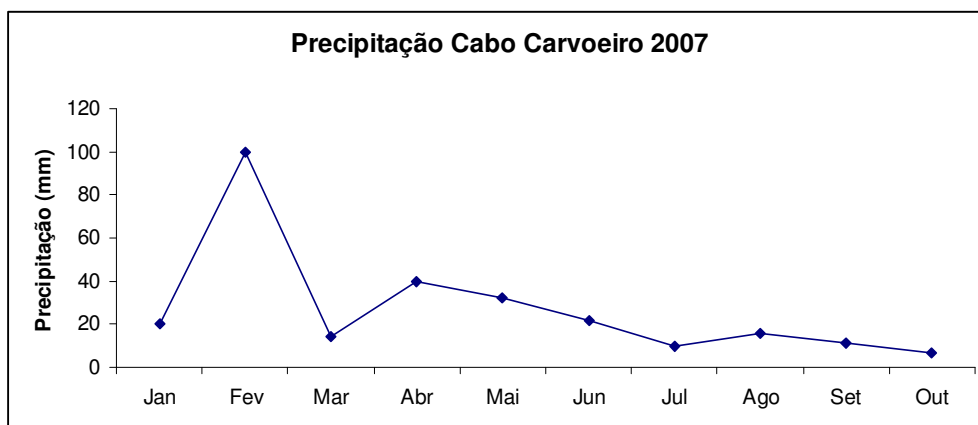
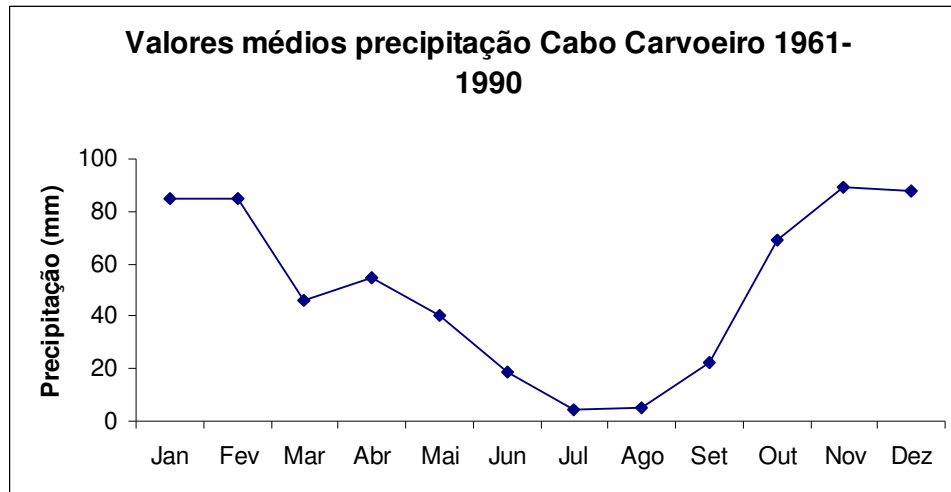


Figura 7 a e b: Comparação da quantidade média de precipitação (mm) em 1961-90 e 2007.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALINO, P. M., SAMMARCO, P. W. & COLL, J. C., 1992b. Competitive strategies in soft corals (Coelenterata, Octocorallia). IV. Environmentally induced reversals in competitive superiority. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 81: 129-145.
- ALINO, P. M. & COLL, J. C., 1989. Observations of the synchronized mass spawning and postsettlement activity of octocorals on the Great Barrier Reef, Australia: Biological aspects. *Bul. Mar. Sci.* 45: 697-707.
- ALVES, M.C.S. 1981. Influência da luz na fixação e desenvolvimento de comunidades incrustantes. Monografia de Bacharelado, Universidade Santa Úrsula - Rio de Janeiro. 73 pp.
- BAKUS, G. J. & THUN, M. 1979. Bioassays on the toxicity of Caribbean sponges. *Colloq. Int. C. N. R. S.* 291: 417-422.
- BAKUS, G. J., TARGETT, N. M. & SCHULTE, B. 1986. Chemical ecology of marine organisms: an overview. *J. Chem. Ecol.* 12: 951-987.
- BOWDEN, B. F., COLL, J. C., TAPIOLAS, D. M. & WILLIS, R. H. 1985. Some chemical aspects of spawning in alcyonacean corals. *Proc. 5th Int. Coral Reef Symp., Tahiti* 6: 325-329.
- BRUSKA, C.B & BRUSKA, G.J. 1990. Invertebrates. Sinauer Associates. Sunderland MA.
- CARVALHO, E.M & ULEDA, V.S. 2004. Colonização por macroinvertebrados bentônicos em substrato artificial e natural em um riacho da Serra de Itatinga, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*.21(2):287-293, junho de 2004

CHIAVERINI, DE. 1970. Repovoamento em superfícies naturais e artificiais por animais do entremarés. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências, USP

CIERESZKO, L. S. & KARNS, T. K. B. 1973. Comparative biochemistry of coral reef. Coelenterates. In: Biology and geology of coral reefs, Vol. II, Biology 1. Jones, O. A., Endean, R. (eds.). Academic Press, New York, p. 183-203.

COELHO, P.A. & RAMOS-PORTO, M. 1980. Littoral benthos from the northeastern part of Brazil: 2. Population of hard substrates. Bolm. Inst. Oceanogr. São Paulo. 29: 133-134.

COLL, J. C., 1992. The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). *Chem. Rev.* 92: 613-631.

COLL, J. C., 1992. The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). *Chem. Rev.* 92: 613-631.

COLL, J. C., BOWDEN, B. F. & CLAYTON, M. 1990. Chemistry and coral reproduction. *Chem. Britain* 26: 761-763.

COLL, J. C., BOWDEN, B. F., ALINO, P. N., HEATON, A., KÖNIG, G. M., DE NYS, R. & WILLIS, R. H., 1989. Chemically mediated interactions between marine organisms. *Chemica Scripta* 29: 383-388.

COLL, J. C., BOWDEN, B. F., KÖNIG, G. M., BRASLAU, R. & PRICE, I. R. 1986. Studies of Australian soft corals – XXXX. The natural products chemistry of alcyonacean soft corals with special reference to the genus *Lobophytum*. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 95: 815-833.

COLL, J. C., LA BARRE, S. C., SAMMARCO, P. W., WILLIAMS, W. T. & BAKUS, G. J., 1982A. Chemical defences in soft corals (Coelenterata: Octocorallia) of the Great Barrier Reef: a study of comparative toxicities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 8: 271-278. *Conservation*. 78: 97-106.

CORREA, M.D. & SILVA, J.L. 1990. Caracterização das comunidades incrustantes e a fauna associada em painéis experimentais na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira. 3: 89-110.

CORREA, M.D. 1989. Comunidades incrustantes e a fauna associada em painéis experimentais na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 236 pp.

CORREA, M.D. 1987. Comunidades incrustantes presentes ao longo do canal de Itajuru em painéis mensais e cumulativos, Cabo Frio, Rio de Janeiro. Anais do I Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira. 2: 264-274.

COSTA, A.L. 1993. Distribuição vertical dos organismos sésseis em painéis na Baía da Guanabara, RJ - Brasil. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Monografia de Bacharelado em Biologia.

COSTA, H.R. 1962. Note preliminaire sur les peuplements intercotidaux de substrat dur du litoral de Rio de Janeiro. Rec. Trav. St. Mar. Endoume. 27: 19-207.

COTÉ, I.M (Editor); REYNOLDS, J.D (Editor). 2006. Coral Reef Conservation. Cambridge University Press. 568 p.

DUH, C. Y., WANG, S. K., WNG, Y. L., CHIANG, M. Y. & DAI, C. F., 1999. Cytotoxic terpenoids from the Formosan soft coral *Nephthea brassica*. *Tet. Lett.* 41: 1401-1403.

DUH, C.Y., WANG, S. K. & WENG, Y. L., 2000. Brassicolene, a novel cytotoxic diterpenoid from the Formosan soft coral *Nephthea brassica*. *Tet. Lett.* 41: 1401-1403.

ESTON, V.R. 1981. Recobrimento primário de substratos artificiais submersos no estuário de Santos (São Paulo, Brasil). Tese de Mestrado. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. 116 pp.

FAUTIN, D.G & MARISCAL, R.N. 1991. Cnidaria: Anthozoa.267-358 In HARRISON, F.W & WESTFALL, J.A.(eds) Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol.2: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora.Wiley-Liss.

FISNER, M.C; MAYAL, E.M; SIAL, A.N & FERREIRA, V.P.2004.Estudo de estresse térmico em Tamandaré- PE, Brasil- Utilizando escleractíneos. Anais do XXV CBZ. P.47.

FLEURY, B. G., 1999. Ecologia Química Marinha: Competição por espaço entre corais e efeitos de nutrientes no metabolismo secundário de macroalgas e octocorais. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, NPPN-CCS, Brasil, pp261.

FLEURY, B. G., COLL, J. C., TENTORI, E., DUQUESNE, S. & FIGUEIREDO, L., 2000. Effect of nutrient enrichment on the complementary (secondary) metabolite composition of the soft coral *Sarcophyton ehrenbergi* (Cnidaria: Octocorallia: Alcyonacea) of the Great Barrier Reef. *Mar. Biol.* 136: 63-68.

FONSECA, A. C. 1998. Estudos sucessionais em uma comunidade dominada por *sargassum furcatum* kutzing, na região de Búzios, Rio de Janeiro-Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia.

GADELHA, J.R. 2006- Estudo do crescimento do Octocoral *Carijoa riisei* (Duchassaing & Michelotti, 1860) (Cnidaria, Alcyonacea) do litoral sul de Pernambuco, Brasil. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco. 43p. Recife.

GERHART, D. J. 1986. Gregariousness in the gorgonian-eating gastropod *Cyphoma gibbosum*: tests of several possible causes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 31: 2545-263.

GUERRAZZI, M.C. 1987. Estudos preliminares sobre a estrutura de uma comunidade de costão rochoso, em mesolitoral, num gradiente de salinidade. Anais do I Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira. 2: 221-232.

HANDAYANI, D., EDRADA, R. A., PROKSCH, P., WRAY, V., WITTE, L., VAN OFWEGEN, L. & KUNZMANN, A., 1997. New oxygenated sesquiterpenes from the Indonesian soft coral *Nephthea chabrolii*. *J. Nat. Prod.* 60: 716-718.

METELO, I.N. 2000. (Tese)- Variação Espacial e Sazonal da Comunidade de Crustáceos da Ilha da Berlenga Departamento de Zoologia. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade de Coimbra. 77 pp.

NETO, J.M. 1999. (Tese)- Variação Espacial e Temporal dos Moluscos do Substrato Rochoso da Ilha da Berlenga. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade de Coimbra. 113 pp.

PAWLIK, J. R., 1993. Marine invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.* 93: 1911-1922.

PUCE, B.S; CALCINAI, G; BAVESTRELLO, C; CERRANO, C & GRAVILI, F.B. 2005. Hydrozoa (Cnidaria) symbiotic with Porifera: a review. *Marine Ecology. Vol. 26*  
*Issue* 2 *Page* 73.

Rama Rao, M., Sridevi, K. V., Venkatesham, U., Prabhaker Rao, T., Lee, S. S. & Venkateswarlu, Y., 2000. Four new sesquiterpenoids from the soft coral *Nephthea chabroltii*. *J. Chem. Research (S)* 245-247.

RITTSCHOF, D. 2001. Natural product antifoulants and coatings development. In: *Marine Chemical Ecology*.

LA BARRE, S. C., COLL, J. C. & SAMMARCO, P. W., 1986a. Defensive strategies of soft corals (Coelenterata: Octocorallia) of the Great Barrier Reef. II. The relationship between Toxicity and feeding deterrence. *Biol. Bull.* 171: 565-576.

ROCHA, RM. 1993. Comunidade incrustante em substrato duro não estabilizado na zona entremarés (São Sebastião, SP). Tese de doutorado. Instituto de Biologia, UNICAMP.



SILVA, E.P. & FERNANDES, F.C. 1990. Os bentos de substrato duro das margens da Lagoa de Araruama, RJ. Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira. 4: 231-240.

SAMMARCO, P. W. & COLL, J. C., 1988. The chemical ecology of alcyonarian corals (Coelenterata: Octocorallia). In: Scheuer, P. J. (ed.) Bioorganic marine chemistry, vol. 2, Springer-Verlag, Berlin, p. 87-116.

SAMMARCO, P. W. & COLL, J. C., 1992. Chemical adaptations in the Octocorallia: evolutionary considerations. Mar. Ecol. Prog. Ser. 88: 93-104.

SAMMARCO, P. W., COLL, J.C. & LA BARRE, S. C., 1985. Competitive strategies of soft corals (Coelenterata: Octocorallia). II. Variable defensive response and susceptibility to scleractinian corals. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 91: 199-215.

SAMMARCO, P. W., LA BARRE, S. & COLL, J. C., 1987. Defensive strategies of soft corals (Coelenterata: Octocorallia) of the Great Barrier Reef. III. The relationship between ichthyotoxicity and morphology. Oecologia 74: 93-101.

STAMPAR, S.N; DA SILVA, P.F & OSMAR J. L.JR. 2007. *Predation on the Zoanthid Palythoa Caribaerorum (Anthozoa, Cnidaria) by a Hawksbill Turtle (Eretmochelys imbricate) in Southeastern Brazil. Marine Turtle Newsletter N.117. Pág. 3.*

VERGARA FILHO, W.L. 1994. Comunidades incrustantes em painéis experimentais imersos no complexo estuarino-lagunar Mundaú-Manguaba, Estado de Alagoas, Brasil. Anais do III Simpósio de Ecossistemas da Costa brasileira. Subsidios a um gerenciamento ambiental. 1: 157-166.

VILLACA, R.C. 1990. Metodologia de amostragem em costões rochosos. Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira. 3: 1-13.

WAHLE, C. M., 1980. Detection, pursuit and overgrowth of tropical gorgonians by milleporid hydrocorals: Perseus and Medusa revisited. *Science* 209: 689-691.

WALLACE, C. C., BABCOCK, R. C., HARRISON, P. L., OLIVER, J. K. & WILLIS, B. L., 1986. Sex on the reef: Mass spawning of corals. *Oceanus* 29: 38-42.

ZALMON, I.R. & SILVA, S.H.G. 1990. Estudo de comunidades incrustantes em painéis experimentais em três áreas da Baía de Guanabara, R.J., Brasil. *Rev. Bras. Biol.*

ZALMON, I.R. 1988. Estudo de comunidades incrustantes sobre painéis experimentais em três áreas da Baía de Guanabara, RJ. Tese de Mestrado, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 195 pp.

## **PARTE B**

### **CARACTERIZAÇÃO DOS CNIDÁRIOS DA COSTA PORTUGUESA**

## INTRODUÇÃO

Os cnidários são animais que estão na base trófica dos ecossistemas na maioria, filtradores e alguns predadores que necessitaram de adaptações para alimentação e defesa, sendo produtores de substâncias urticantes e apresentam muitas vezes cores vibrantes ou investem em camuflagens, sendo também simbióticos muito elaborados. Estes aspectos fazem salientar a importância de compreender o funcionamento e os mecanismos de sobrevivência e colonização destes organismos.

Sabe-se que alguns cnidários são formadores de barreiras naturais, os chamados “recifes de corais”, caracterizados como berçário e fortaleza para os organismos de ecossistemas aquáticos. As Berlengas apresentam uma cnidofauna caracteristicamente proveniente dessas várias zonas de dispersão. Os cnidários colectados na reserva natural das Ilhas Berlengas foram identificados durante todo o desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação e qualificação da colonização dos substratos. Os cnidários, sesséis e os vágéis podem fornecer informações importantes a respeito dos impactos ambientais, já que se encontram próximo à base da cadeia trófica (CARVALHO & ULEDA, 2004).

A dispersão dos cnidários das zonas temperadas apresentam uma maior amplitude de variação térmica, visto que nessas zonas a temperatura média é mais baixa que nas regiões tropicais, portanto, estes toleram mais as amplitudes, porém, apresentam uma temperatura ótima para o ciclo reprodutivo e consequentemente para a dispersão dos seus gametas e colonização dos substratos. Outros factores tais como a luz podem influenciar o desenvolvimento destes organismos. Segundo Gadelha & Pérez (2006), o crescimento de alguns antozoários é condicionado pela presença ou ausência de luz e também pela sazonalidade, apresentando menor crescimento na estação seca.

As Ilhas Berlengas são uma zona de extrema importância geológica, ecológica, biológica e turística e, por isso, uma área de estudos de grande relevância para entender o funcionamento dos ecossistemas aquáticos. Trata-se de uma área influenciada por correntes marinhas diversas: águas glaciares e Nórdicas, mediterrânicas e atlânticas, caracterizada principalmente pela falha geológica da Nazaré. Alterações climáticas, meteorológicas e oceanográficas ocasionam adaptações ecológicas por parte destes

organismos, caracterizados pela sua extrema sensibilidade aos agentes forçadores externos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O levantamento fotográfico foi realizado através de mergulho subaquático, cerca de 20, utilizando uma câmara fotográfica (Modelo Canon Power Shot A70). Foram fotografados os cnidários que ocorrem na reserva natural das Ilhas Berlengas (Fig.1). As identificações ao nível taxonómico e sistemático foram feitas através de guias de identificação publicados pelo IPIMAR. Alguns espécimes foram colectados para confirmação taxonómica após a análise laboratorial.

## RESULTADOS

### Distribuição Geográfica das Espécies de Cnidários das Ilhas Berlengas

As espécies de cnidários identificadas nas ilhas Berlengas encontram-se listadas na Tabela 1. Visto que 95% das espécies encontradas na costa Portuguesa, ocorrem nas Ilhas Berlengas ficou-se com uma referência acerca da constituição taxonómica da costa Portuguesa-

Foram encontradas as seguintes espécies do Phylum Cnidaria: *Eunicella verrucosa* (Pallas, 1766), *Actinothoe sphyrodeta* (Gosse, 1858), *Corynactis viridis* (Allman, 1846), *Alcyonium glomeratum* (Hassall, 1843), *Parazoanthus axinellae* (Schmidt, 1862), *Leptosammia pruvoti* (Lacaze-Duthiers, 1897), *Cerianthus membranaceus* (Spallanzani, 1784), *Paramuricea clavata* (Risso, 1826), *Anemonia viridis* (Forsk., 1775), *Aiptasia mutabilis* (Gravenhorst, 1831), *Actinia equina* (Linnaeus, 1758) (Fig.1). Nas Figs. 2 e 3. são indicadas as áreas de distribuição destas espécies no globo. Foram colectadas para análise e identificação em laboratório *Corynactis viridis*, *Actinothoe sphyrodeta*, *Eunicella verrucosa*, *Leptosammia pruvoti* e *Alcyonium glomeratum*. De modo a iniciar a construção de uma base de dados da cnidofauna das Ilhas Berlengas, foi efectuado um levantamento fotográfico de todas as espécies encontradas, para uma apuração da (s) espécie (s) mais abundante(s) para a realização de estudos posteriores.

## DISCUSSÃO

As espécies de cnidários encontrados nas Ilhas Berlengas, correspondem à maioria das encontradas em toda a costa. Sendo estas espécies de origem Nórdica, Ilhas Britânicas, Mediterrânicas, costa Noroeste da África e ocorrem também nos Açores e Canárias.

As espécies foram encontradas em profundidades que variam dos 6 aos 25 metros, *Eunicela verrucosa* aos 30 metros. Nas Ilha Estelas foram observados espécimens de *Alcyonium glomeratum* em abundância fixados às rochas e recebendo forte influência das correntes. Algumas espécies foram encontradas em zonas mais abrigadas e sem exposição solar: *Corynactis viridis*, *Actinothoe sphyrodeta* e *Aiptasia mutabilis*. A espécie *Anemonia sulcata* foi encontrada no seu ponto mais raso, aos 2 metros na baixa-mar.

Os cnidários descritos ocorreram geralmente associados à substratos rochosos fortemente colonizados por algas, esponjas, ascídeas. A fauna acompanhante era sobretudo composta por poliquetas, camarões, carangueijos e moluscos. Os cnidários encontrados nas Berlengas compreenderam representantes sobretudo da classe anthozoa. Das 11 espécies observadas, 6 são representantes da subclasse hexacorallia, 3 da subclasse octocorallia e 2 da subclasse zoantharia.

Apesar de ter sido efectuada apenas uma análise qualitativa, pode constatar-se uma abundância pouco elevada e dispersa dos organismos indiciando adaptações ecológicas ao grau de exposição em resposta a factores extrínsecos. Este estudo preliminar dos cnidários revelou a grande necessidade de realização de um longo estudo exaustivo na costa portuguesa a cerca da sistemática, ocorrência sazonal e espacial dos cnidários.

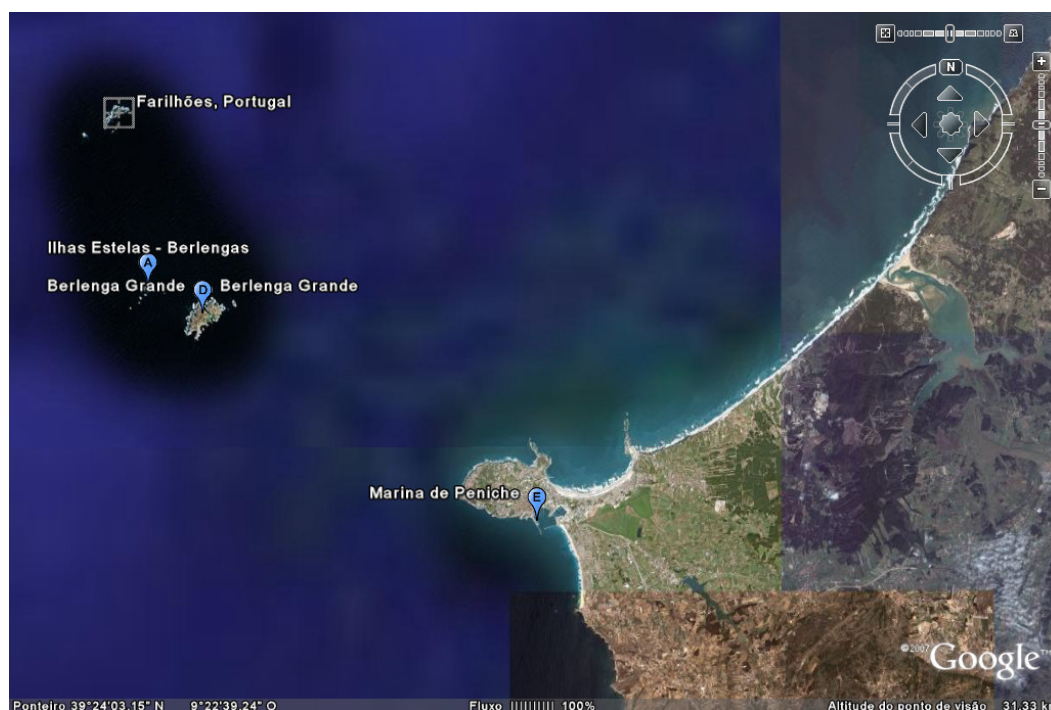


Figura 1. Representação Geográfica da área de Amostragem fotografada, Arquipélago das Berlengas: Berlenga grande, Estelas e Farilhões-Forçadas.

Tabela 1: Lista de filós fotografados nas Ilhas Berlengas.

(\*Parafilético- Possui representantes nos dois reinos Plantae e Protista)

Reino	Filo	Classe	Representante
Plantae /Protista*	Chlorophyta		Algas verdes
Straminophila	Phacophyceae		Algas Castanhas
Protista	Rodophyta		Algas Vermelhas
Animalia	Porifera	Calcispongiae Desmospongiae	esponjas
	Cnidaria	Anthozoa Hidrozoa	Anémonas, corais duros e hidrozoários
	Bryozoa	Gymnolaemata	foliáceos
	Annelida	Polychaeta	sabelaridae
	Lophophorata		
	Mollusca	Gastropoda Cephalopoda	Litorinas, nudibrânquios e pólvos
	Arthropoda	Malacostraca	decápodes
	Echinodermata	Stelleroidea Ophiuroidea Holothuroidea Echinoidea	Ouriços-do-mar, ofiúros, estrelas-do- mar e pepinos
	Chordata Subfiló Urochordata Subfiló Vertebrata	Ascideaceae Osteichtheys	Ascídeas e peixes



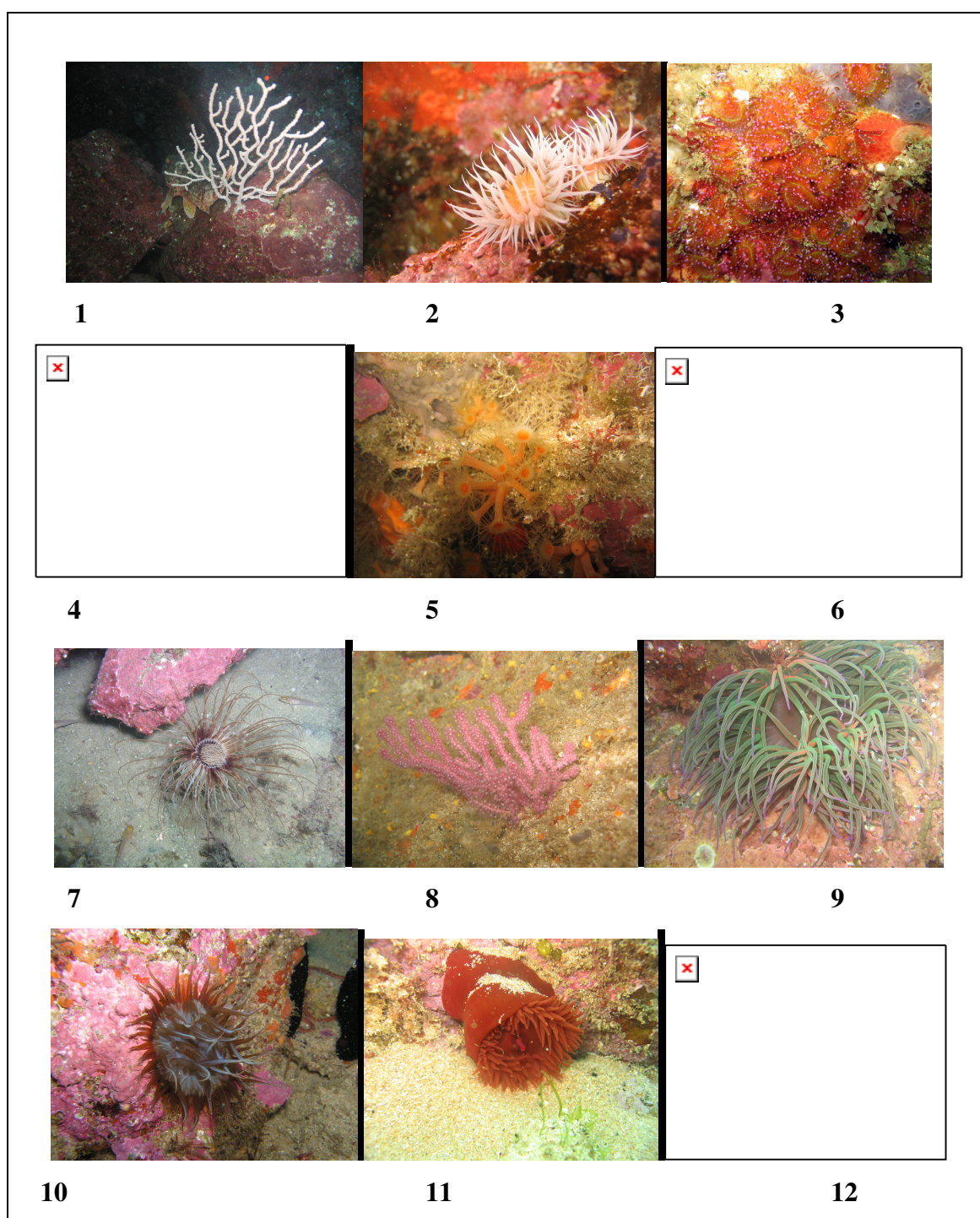


Figura 2. Espécies de cnidários identificados nas Ilhas Berlengas: 1- *Eunicella verrucosa* (Pallas, 1766), 2- *Actinothoe sphyrodeta* (Gosse, 1858), 3- *Corynactis viridis* (Allman, 1846), 4- *Alcyonium glomeratum* (Hassal, 1843), 5- *Parazoanthus axinellae* (Schmidt, 1862), 6- *Leptosammia pruvoti* (Lacaze-Duthiers, 1897), 7- *Cerianthus membranaceus* (Spallanzani, 1784), 8- *Paramuricea clavata* (Risso, 1826), 9- *Anemonia viridis* (Forskal, 1775), 10- *Aiptasia mutabilis* (Gravenhorst, 1831), 11- *Actinia equina* (Linnaeus, 1758) e 12- *Leptogorgia sarmentosa* (Esper, 1789).



Figura 3: Distribuição Geográfica das espécies do Phylum Cnidaria encontradas nas Ilhas Berlengas.

## **Posição sistemática das espécies de cnidários encontrados nas Ilhas Berlengas**

*Eunicella verrucosa* (Pallas, 1766)

Classe Anthozoa

Subclasse Octocorallia

Ordem Gorgonacea

Família Plexauridae

Género *Eunicella*

*Actinothoe sphyrodeta* (Gosse, 1858)

Classe Anthozoa

Subclasse Hexacorallia

Superordem Hexactiniida

Ordem Actiniaria

Subordem Nynantheae (Thenaria : Acontiaria)

Família Sagartiidae

Género *Actinothoe*

*Corynactis viridis* (Allman, 1846)

Classe Anthozoa

Subclasse Hexacorallia

Ordem Corallimorpharia

Família Corallimorphidae

Género *Corynactis*

*Alcyonium glomeratum* (Hassal, 1843)

Classe Anthozoa

Subclasse Octocorallia

Ordem Alcyonacea

Família Alcyoniidae

Género *Alcyonium*

*Parazoanthus axinellae* (Schmidt, 1862)

Classe Anthozoa

Subclasse Zoantharia

Ordem Zoanthidea

Família Parazoanthidae

Género *Parazoanthus*

*Leptosammia pruvoti* (Lacaze-Duthiers, 1897)

Classe Anthozoa

Subclasse Zoantharia

Ordem Scleractinia

Família Dendrophylliidae

Género *Leptopsammia*

*Cerianthus membranaceus* (spallanzani, 1784)

Classe Anthozoa

Subclasse Hexacorallia

Ordem Ceriantharia

Subordem Spirularia

Família Cerianthidae

Género *Cerianthus*

*Paramuricea clavata* (Risso, 1826)

Classe Anthozoa

Subclasse Octocorallia

Ordem Gorgonacea

Família Paramuriceidae

Género *Paramuricea*

*Anemonia viridis* = *A. sulcata* (Forskål, 1775).

Classe Anthozoa

Subclasse Hexacorallia

Ordem Actiniaria

Família Actiniidae

Género *Anemonia*

*Aiptasia mutabilis* (Gravenhorst, 1831) = *A. Couchii*

Classe Anthozoa

Subclasse Hexacorallia

Ordem Actiniaria

Subordem Nynantheae

Família Aiptasiidae

Género *Aiptasia*

*Actinia equina* (Linnaeus, 1758)

Classe Anthozoa

Subclasse Hexacorallia

Ordem Actiniaria

Subordem Nynantheae

Família Actiniidae

Género *Actinia*

*Leptogorgia sarmentosa*

Classe Anthozoa

Subclasse Octocorallia

Ordem Gorgonaria

Família Gorgonidae

Género *Leptogorgia*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUSKA, C.B & BRUSKA, G.J. 1990. Invertebrates. Sinauer Associates. Sunderland MA.

COTÉ, I.M (Editor); REYNOLDS, J.D (Editor). 2006. Coral Reef Conservation. Cambridge University Press. 568 p.

FAUTIN, D.G & MARISCAL, R.N. 1991. Cnidaria: Anthozoa.267-358 *In* HARRISON, F.W & WESTFALL, J.A.(eds) Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol.2: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora.Wiley-Liss.

FISNER, M.C; MAYAL, E.M; SIAL, A.N & FERREIRA, V.P.2004.Estudo de estresse térmico em Tamandaré- PE, Brasil- Utilizando escleractíneos. Anais do XXV CBZ. P.47.

VILLACA, R.C. 1990. Metodologia de amostragem em costões rochosos. Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira. 3: 1-13.

## **PARTE C**

### **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE CNIDÁRIOS DA COSTA NOROESTE PORTUGUESA**

## ANEXO I

(ARTIGO À SUBMETER A REVISTA SCIENTIA MARINA)

### **CARACTERIZAÇÃO ELEMENTAR E BIOQUÍMICA DOS COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE *Anemonia sulcata* (CNIDARIA) DA COSTA NOROESTE ATLÂNTICA (PORTUGAL).**

**Gadelha<sup>1</sup>, J.R.; Santos<sup>2</sup>, S; Soares<sup>1,3</sup>, A.M.V.M; Morgado<sup>1,3</sup> & F Humanes<sup>2</sup>, M.**

1-Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro. Campus Univeritário de Santiago, 3810. Aveiro, Portugal. [jrgadelha@ua.pt](mailto:jrgadelha@ua.pt); [fmorgado@ua.pt](mailto:fmorgado@ua.pt). fone : 234 370 786

2 -Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Cidade Universitária - Edifício C5, Campo Grande 1749-016. Lisboa.

3- CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

## RESUMO

Ao longo dos últimos anos, tem-se continuamente investigado o metabolismo secundário de invertebrados e microorganismos marinhos, objectivando não somente o isolamento de produtos naturais biologicamente activos, mas também estruturalmente inéditos ou taxionomicamente relevantes. A *Anemonia sulcata* é uma espécie amplamente estuda nas Ilhas Britânicas, Yugoslávia, Itália, França e na Alemanha é estudada deste a década de 70, somente muito recentemente começou a ser estudada na Península Ibérica, visto que esta espécie encontra-se abundante ao longo de toda a costa Noroeste de Portugal. Neste contexto os objectivos gerais deste trabalho foram realizar a extracção de compostos químicos de *Anemonia sulcata*, no âmbito da identificação de substâncias intervenientes no seu comportamento ecológicos, elucidação estrutural e análise da eventual actividade ecológica das substâncias obtidas. As metodologias desenvolvidas podem ser utilizadas em estudos quer de variação temporal quer geográfica na produção de metabolitos secundários, ambos aspectos de grande importância e ainda pouco explorados no estudo de ecologia marinha em Portugal. A



cromatografia de camada fina, revelou que o extrato de *Anemonia sulcata* é complexo, ou seja, possui vários compostos. Foram identificadas manchas com diferentes pesos moleculares, como substâncias de pigmentação, clorofila, carotenóides, esteróides. O trabalho realizado constituiu apenas uma abordagem preliminar que envolveu, apesar disso, toda a costa Portuguesa, tendo-se centrado a atenção apenas na análise da composição química elementar de *Anemonia sulcata*. Face aos interessantes resultados obtidos será aconselhável a realização de trabalhos futuros com um grau de abordagem mais específico.

**PALAVRAS-CHAVES:** Perfil Químico, Extratos, Anémonas, Costa Portuguesa.

## **ABSTRACT**

In the last years it has been continuously investigated the secondary metabolism of invertebrates and marine organisms, pretending not only the isolation of natural products biologically active, but also unknown or taxonomically relevant. *Anemonia sulcata* is a species widely studied in the British Islands, Yugoslávia, Italy, France and in Germany since the decade of 70, but only very recently started to be studied in the Iberian Peninsula, presenting a large distribution throughout all the northwest coast of Portugal. In this context the main objectives of this work had been to carry out the extraction of chemical composites of *Anemonia sulcata*, in the scope of the identification of substances intervening in its ecological behavior, structural briefing and analysis of the eventual ecological activity of those substances. The developed methodologies can be used in studies of temporal or geographical variations in the production of secondary metabolites, both aspects of great importance and still little explored in the study of sea ecology in Portugal. The chromatography of fine layer, disclosed that the extract of *Anemonia sulcata* is complex, or either, possess some composites. Spots with different molecular weights had been identified, as substances of pigmentation, chlorophyll, carotenoids and esteroids. This work constituted only one preliminary approach that involved, despite this, the Portuguese coast, having itself centered the attention only in the analysis of the elementary chemical composition of *Anemonia sulcata*. Due to the interesting results obtained will be advisable the accomplishment of future works with a more specific approach.

**KEY-WORDS:** Chemical Profile, Extracts, Anemones, Portuguese Coast

## INTRODUÇÃO

Nos últimos vinte anos, muitos estudos têm sido realizados com o intuito de desvendar a origem de metabolitos em corais, algas, esponjas, ascídeas, briozoários e moluscos (Coll, 1992) (Rama Rao *et al.*, 2000). Muitos metabolitos secundários possuem propriedades bioactivas na farmacologia (citotóxica) (Duh *et al.*, 1999, 2000) (Duh *et al.*, 1999) ou na ecologia (ictiotóxica ou alelopática) (Sammarco *et al.*, 1985; Sammarco & Coll, 1992; Coll, 1992). (Handayani *et al.*, 1997). A diversidade estrutural dessas substâncias, associada às suas actividades biológicas, tem atraído continuamente a atenção de diversos grupos de investigação do mundo inteiro (Blunt *et al.*, 2003). Todavia, em Portugal, a investigação em produtos naturais de origem marinha é ainda incipiente, apesar desta ter sido iniciada há mais de 30 anos (Kelecom, 1997; 1998). Ao longo dos últimos anos, tem-se continuamente investigado o metabolismo secundário de invertebrados e microorganismos marinhos, objectivando não somente o isolamento de produtos naturais biologicamente activos, mas também estruturalmente inéditos ou taxonomicamente relevantes (Roberge *et al.*, 1998; Berlinck *et al.*, 1998; . Lindsay *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2000; Granato *et al.*, 2000; Britton *et al.*, 2001; Saeki *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002a; 2002b), particularmente em produtos naturais de corais, esponjas, ascídias e moluscos.

A *Anemonia sulcata* é uma espécie amplamente estudada nas Ilhas Britânicas, Yugoslávia, Itália, França e na Alemanha é estudada desde a década de 70, somente muito recentemente começou a ser estudada na Península Ibérica, visto que esta espécie encontra-se abundante ao longo de toda a costa Noroeste de Portugal.

Estudos recentes com esta espécie têm incidido sobre estudos da sua ecologia, por exemplo, de fauna associada (Calado *et al.*, 2007), estudos de metabolismo bioquímico e farmacológico (Buck & Schlichter, 1987; Taborská *et al.*, 1999; Rack *et al.*, 1983; Habermehl *et al.*, 1999; Maretic & Russell, 1983), isolamento de toxinas (Martinez & Kopeyan, 1977; Ash *et al.*, 1981; Cariello & D'Aniello, 1975; Sanchez *et al.*, 1996; Bikfalvi *et al.*, 1988; Tazieff-Depierre *et al.*, 1999; Tesseraux & Alsen, 1999) e também estudos de biotransformação química (Tytler & Davies, 1984, 1986; Dorsett, 1984; Alsen *et al.*, 1978). Através destes estudos, pela aplicação de técnicas de purificação de proteínas, métodos bioquímicos e de extracção química, foi revelada a

toxicidade de compostos de *Anemonia sulcata* e a presença de cinco toxinas, ATX I, II, III, IV e V. Estas toxinas actuam como inibidores polivalentes da protease, um inibidor do elastase, dois polipeptídeos depressivos da pressão sanguínea e muito recentemente os peptídeos que inibem o competidor <sup>125</sup>I-dendrotoxina às membranas cerebrais.

Neste contexto os objectivos gerais deste trabalho foram realizar a extracção de compostos químicos de cnidários, no âmbito da identificação de substâncias intervenientes no seu comportamento ecológicos, elucidação estrutural e análise da eventual actividade ecológica das substâncias obtidas. As metodologias desenvolvidas podem ser utilizadas em estudos quer de variação temporal quer geográfica na produção de metabolitos secundários, ambos aspectos de grande importância e ainda pouco explorados no estudo de ecologia marinha em Portugal.

Especificamente os objectivos visaram (i) a caracterização elementar dos compostos químicos de *Anemonia sulcata*, (ii) traçar o seu perfil químico nos diferentes locais de amostragem da costa Portuguesa, (iii) identificação da natureza dos compostos e (iv) identificar as influências espaciais na composição bioquímica dos organismos. As hipóteses testadas foram: os compostos são facilmente revelados pelas técnicas de extracção de compostos químicos? A natureza dos compostos poderá ser indicador de funções ecológicas? Existem diferenças espaciais na composição química elementar do organismo?

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Espécie estudada

A espécie escolhida para o estudo foi uma anémone *Anemonia sulcata* (Fig.1) que vive ligada às rochas, seixos, algas, mexilhões nas poças deixadas pela maré. Encontram-se até aos 20 metros de profundidade. Esta é uma anémone urticante, apesar disto muitas espécies animais encontram-se refugiados nos seus tentáculos. Encontram-se no Nordeste do Atlântico, Mediterrâneo e Canal da Mancha, é localmente conhecido no Mar do Norte Costa Atlântica Portuguesa (Noroeste). Foram colectas 10 amostras de *Anemonia sulcata* em cada uma das quatro praias, nas zonas de costão rochoso, na baixa-mar.

## Àrea de Estudo

Para a área de amostragem foram seleccionados 4 pontos ao longo da costa Noroeste de Portugal: norte- Praia de Viana do Castelo, Praia da Aguda (Porto), Centro- Praia de São José do Estoril (Lisboa), Sul- Praia do Tonel (Sagres) (Fig.2). As áreas de amostragens foram seleccionadas pelas suas diferenças geográficas, e também quanto e pelo seu nível de exposição (praia exposta/abrigada).

### Local de Amostragem Norte

#### **Praia de Viana do Castelo (41°41'35,16"N, 8°51'4,33"O, elevação = 6m**

Praia de formação rochosa, abrigada na baixa mar; as anémonas foram encontradas em pequenas fendas entre as rochas, recebendo influência directa do mar (figura 3 e 4). Anémonas de grande tamanho (de 15 a 20 cm), sempre em colónia, podendo indicar ciclo de reprodução, associados à mexilhões (*Mytilus spp.*) e também oligoquetas. Apresentam-se afastadas da constituição por algas (*Fucus vesiculosus*), na porção mais rasa da constituição rochosa, as que se encontram na porção mais rasa, apresentou uma coloração mais esverdeada, podendo indicar uma diminuição de oxigenação dos tecidos ou associações com organismos autotróficos clorofilados, já que as espécies submersas apresentavam-se de coloração castanha. Aparecem ao lado de outra anémona comum na costa Portuguesa *Actinia equina*, lesma-do-mar (*Aplysia fasciata*), ouriços-do-mar (*Paracentrotus lividus*).

#### **Praia da Aguda- Porto (41° 2'52,35"N, 8°39'13,28"O, elevação = 10 m)**

Praia de Enseada, abrigada, de formação rochosa e sedimento arenoso grosso (Fig 5 e 6). Recebe influência directa do mar, na baixa mar, anémonas encontram-se enterradas na areia associadas à mexilhões (*Mytilus spp.*), ou ligadas à rocha pelo seu pedúnculo tanto de forma isolada quanto em colónia, com mais ou menos 10 a 20 cm de tamanho.

## **Local de Amostragem Centro**

**Praia São Pedro do Estoril- Lisboa (38°41'39,11"N, 9°22'26,27"O, elevação 9 m)**

Praia de Enseada com formação Rochosa, numa zona abrigada (Baía) recebendo influência direta do mar e indireta do rio Tejo (Figura 7 e 8). As anémonas encontram-se aderidas às rochas na baixa-mar.

## **Local de Amostragem Sul**

**Praia do Tonel – Sagres (38°59'46,49"N, 8°57'1,43"O, elevação = 0 m)**

Praia de formação rochosa, exposta e com influência marinha directa (figura 9 e 10). As anémonas aparecem agrupadas em pequenas poças isoladas de água e fixadas às paredes das rochas, com tamanhos reduzidos de 5 a 10 cm encontrando-se associadas a mexilhões e a anémonas *Actinia equina*.

## **Local de Amostragem Insular**

### **Ilhas Berlengas**

**Cova do Sonho- Berlengas (39°24'38,27"N, 9°30'47,01"O, elevação =0 metros)**

Praia de formação rochosa, exposta e com influência marinha directa (Figura 11 e 12). As anémonas aparecem fixadas às paredes das rochas, com tamanhos reduzidos de 5 a 10 cm encontrando-se associadas a outras anémonas (*Aiptasia mutabilis*), esponjas, nudibrânquios e ascídeas.

## **TRABALHO LABORATORIAL**

### **Técnicas Utilizadas**

Foi utilizada a técnica de extração de compostos químicos através de material orgânico, Cromatografia de Camada fina (TLC) e Infravermelho (BRAUN, 1987).

### **PRÉ-PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS- Extração**

O material orgânico (anémoma) foi colectado e acondicionado com água do mar em frigorífico a  $-2^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização. Para utilização, foi necessário descongelamento e pesar as amostras e então macerar com 10 ml de Acetona Pura ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), para cada indivíduo, colocando o extrato dissolvido num erlenmeyer com um agitador magnético (Função de misturar o solvente ao material biológico) por 60 minutos. O material resultante foi filtrado com uma placa de porcelana porosa, utilizando o método de filtração à vácuo (para acelerar o processo). Obtendo-se então material dissolvido (extrato 1) e resíduos. Sendo mais uma vez o material residual misturado à 10 ml de acetona pura, mais 60 minutos no agitador magnético que é então filtrado e separado material dissolvido (extrato 2) e resíduos. O extrato 1 foi então misturado ao extrato 2, sendo novamente filtrado e pesado. O material foi então fracionado com éter, resultando em duas camadas com diferentes densidades: fase líquida ou aquosa (camada inferior) e fase densa (camada superior), sendo separadas em dois diferentes balões de fundo redondo. É adicionado à fase aquosa 10 ml de éter (esta fase é mais polar que o éter) e volta a fraccionar resultando duas fases etéreas. Com todo material denso (éter + compostos) junto num balão, é adicionado 1 mg de agente secante (absorve a água)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Sulfato de Sódio), misturando-se até extrair toda a água. Filtra-se e por fim o material vai ao evaporador rotativo, não ultrapassando  $29-30^{\circ}\text{C}$ , até estar totalmente viscoso e pronto para a aplicação nas placas de sílica gel da Cromatografia de Camada Fina.

## **Cromatografia de Camada Fina**

A cromatografia de camada fina, tem por finalidade potencializar vantagem da adsorção, e como as amostras eram compostas de material extraído + éter, e foram testadas em hexano, composto pouco polar(eluente- fase móvel) que fornece pouca ligação, por isso foi necessário testar diversas concentrações que forneçam boas ligações, ou seja, compostos polares, mais distantes do Hexano na escala de polaridade. Foram testadas soluções com diferentes concentrações de Hexano-Acetato de Etil, nas seguintes proporções: Hexano puro, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1 e 3:7 em 10 ml de solução, sendo o solvente principal de maior concentração o hexano e o acetato de etil o segundo solvente. Depois de expostas as amostras às diferentes concentrações de Hexano-Acetato de Etil, foi verificado se as placas apresentavam manchas visíveis de compostos presentes na amostra, ou se estas manchas eram visíveis à luz ultravioleta (254 nm- luz verde), se não, são necessários pulverizar as placas cromatográficas em reveladores (genéricos-ácido sulfúrico ou específicos- Erlich), em seguida, aquece-se as placas para revelar manchas, se houverem.

## **Infravermelho**

Esta técnica consiste basicamente na obtenção de informação específica acerca da interação pela luz infravermelho com a matéria do composto. Os valores são calculados a partir de uma relação matemática entre a frequência e o comprimento de onda emitido. Para uma descrição mais detalhada consultar (Volland, 1999).

## **RESULTADOS**

Os resultados da cromatografia de camada fina, para a quantificação de compostos que aparecem nas amostras obtidas da extração química de *Anemonia sulcata* encontram-se na Tabela 1. Os resultados revelam a presença de compostos polares e pode haver a presença de carotenóides.

Para o extrato de éter de *Anemonia sulcata* do ponto de amostragem insular: Ilhas Berlengas, a cromatografia nas diferentes concentrações de Hexano/Acetato de etil, revelou na solução 3 o que pode ser um esteróide (Lipídio) um possível constituinte

da membrana do organismo e na solução 5 houve a presença de os quais podem ser carotenóides e clorofila *a* (Fig 13)

Para o extrato de éter de *Anemonia sulcata* dos pontos de amostragem continental Viana do Castelo, Aguda, Estoril e Sagres foi observado que, para as amostras de Viana do Castelo (Fig. 14), Aguda (Fig. 15) e Estoril (Fig. 16) nas soluções 3 e 5 revelou o que pode ser um carotenóide (compostos com C e H) de cor alaranjada.

Para o extrato de *A. sulcata* no ponto de Amostragem Sul- Sagres (Fig. 17) foram reveladas na solução 3 elementos de coloração verde, podendo ser clorofila. Houve a presença de manchas amarelas que podem ser xantofilas (compostos oxigenados e com cadeias de CH).

Os resultados do infravermelho revelaram (Fig. 18), que o extrato de *Anemonia sulcata* do ponto de amostragem insular apresentam elementos cuja composição é rica em carbonos e hidrogênios, saturados esteróides, sem duplas ligações ésteres ou acetonas.

Os resultados do infravermelho revelaram, que o extracto de *A. sulcata* do ponto de amostragem continental (Figs. 19 a 21), apresentou maior diferença de composição química na praia de S. Pedro do Estoril. Nos resultados de infravermelho do extrato de *Anemonia sulcata* do ponto de Amostragem Norte Viana do Castelo, não puderam ser obtidos resultados, pois a quantidade de amostra era insuficiente para realizar-se a leitura, foram feitas tentativas de fraccionar com solvente, porém toda a leitura apenas reconhecia o solvente.

## DISCUSSÃO

A cromatografia de camada fina, revelou que o extrato de *Anemonia sulcata* é complexo, ou seja, possui vários compostos. Foram identificadas manchas com diferentes pesos moleculares, como substâncias de pigmentação, clorofila, carotenóides, esteróides. Foi também demonstrado que de acordo com o observado na Tabela 1 e Figs. 13 e 14, a concentração elevada Hexano/ acetato de etil 9:1 (na solução 3), composto pouco polar, ou seja, que fornece poucas ligações entre os elementos, reduziu o número de elementos, sendo isto um indicativo que as substâncias presentes neste extrato são polares, ou seja, pouco solúveis em água. Outro resultado interessante, foi a presença de clorofila, indicando assim, a presença de simbiose com organismos



autotróficos (talvez algas). Os esteróides encontrados podem ser componentes da membrana plasmática do organismo.

Na análise de infravermelho, apesar dos espectros apenas fornecerem informações qualitativas e limitadas sobre o tipo de grupos funcionais que estão presentes nos extractos, dão, no entanto, uma indicação do tipo e da natureza dos compostos presentes. Todos os extractos obtidos compreenderam compostos alifáticos, ou seja com cadeias ou ciclos saturados, porque temos em todos as bandas características das ligações  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}$  entre  $2800$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Esta informação é importante, porque se sabe que entre os comprimentos de onda  $1000$  e  $4000$ , existem as regiões dos grupos funcionais (informação generalista a cerca dos compostos), e entre os comprimentos  $600$  e  $1000$ , podemos obter informações mais específicas a cerca da composição química (“Fingerprint”). Todas devem também ter algum ou alguns compostos com duplas ligações (alquenos) por causa da banda ligeiramente acima de  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Todas as amostras parecem ter também algum tipo de função  $\text{OH}$  devido à banda a cerca  $3500\text{ cm}^{-1}$ . No que se diferenciam os extractos é na banda à volta de  $1700\text{ cm}^{-1}$  que para o espécimen do Estoril é diferente dos outros. Enquanto nos outros todos parece que existem compostos com um grupo éster (banda a cerca  $1740\text{ cm}^{-1}$ ) neste a banda do grupo carbonilo aparece a  $1709\text{ cm}^{-1}$ , o que pode ser atribuível a uma cetona ou um ácido.

Os compostos encontrados na TLC sugerem ser um constituinte da membrana, ou seja um esteróide (Colesterol) que é uma redução que ocorre em membranas de animais e plantas, que desempenha um importante papel estrutural. Outro tipo de compostos encontrados foram os carotenóides que ocorrem em todos os tecidos fotossintéticos (uma folhagem verde, bactérias fotossintéticas e algas). Ocorrem em íntima associação com a clorofila onde são armazenados e aparentemente agem como “scavengers” para remover o oxigênio potencialmente nocivo contendo radicais e estados agitados formados concomitantemente com os processos primários da fotossíntese.

O trabalho realizado constituiu apenas uma abordagem preliminar que envolveu, apesar disso, toda a costa Portuguesa, tendo-se centrado a atenção apenas na análise da composição química elementar de *Anemonia sulcata*. Face aos interessantes resultados obtidos será aconselhável a realização de trabalhos futuros com um grau de abordagem mais específico.

## CONCLUSÃO

Apesar das características preliminares deste trabalho, foi efectuada a caracterização elementar e bioquímica dos compostos extraídos de *Anemonia sulcata* da costa noroeste Atlântica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSEN, C; BÉRESS, L & TERESSEAU, I. 1978. Toxicities of Sea Anemone (*Anemonia sulcata*) Polypeptides in Mammals. *Toxicon*. Vol. 16. 561-566.

ASH,P; HIDER, R.C; MÉNEZ, A & WUNDERER, G. 1981. Surface Activity of Polypeptide Toxins Isolated from *Anemonia sulcata*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 669. 231-235.

BERLINCK, R. G. S.; BRITTON, R.; PIERS, E.; LIM, L.; ROBERGE, M.; ROCHA, R. M.; ANDERSEN, R. J. 1998. *J. Org. Chem.* 63, 9850.

BIKFALVI, A; BINDER, A; BÉRESS, L & WASSERMANN, O. 1988. Isolation and Blood Coagulation Inhibition of a New Proteinase Inhibitor from the Sea Anemone *Anemonia sulcata*. *Comp.Biochem.Physiol.* Vol.89B, No.2. 305-308.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R.; *Nat. Prod. Rep.* 2003, 20, 1.

BRITTON, R.; DE OLIVEIRA, J. H. H. L.; ANDERSEN, R. J.; BERLINCK, R. G. S.; *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 254.

BRAUN, R.D. 1987. Introduction to Instrumental Analysis, McGraw-Hill International Editions, Chemistry Series.

BUCK, M & SCHLICHTER. 1987. Driving Forces for the Uphill Transport of Amino Acids Into Epidermal Brush Border Membrane Vesicles of the Sea Anemone *Anemonia sulcata* (Cnidaria, Anthozoa). *Comp.Biochem.Physiol.* Vol. 88<sup>a</sup>. No.2. 273-279.

CALADO, R; DIONÍSIO, G & DINIS, M.T. 2007. Decápod crustaceans associated with the sbakelock anemone *Anemonia sulcata*. Living there or just passing by? *Scientia Marina*. 71 (2). 287-292. Spain.

CARIELLO, L & D'ANIELLO, A. 1975. Isolation and Characterization of Four Toxic Protein Fractions from the sea Anemone *Anemonia sulcata*. *Toxicon*. Vol. 13. 353-357.

COLL, J. C., 1992. The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). *Chem. Rev.* 92: 613-631.

DORSETT, D.A. 1984. Oxygen Production in the Intertidal Anemone *Anemonia sulcata*. *Comp.Biochem.Physiol.* Vol. 78<sup>a</sup>, No.2. 225-228.

DUH, C. Y., WANG, S. K., WNG, Y. L., CHIANG, M. Y. & DAI, C. F., 1999. Cytotoxic terpenoids from the Formosan soft coral *Nephthea brassica*. *Tet. Lett.* 41: 1401-1403.

DUH, C.Y., WANG, S. K. & WENG, Y. L., 2000. Brassicolene, a novel cytotoxic diterpenoid from the Formosan soft coral *Nephthea brassica*. *Tet. Lett.* 41: 1401-1403.

GRANATO, A. C.; BERLINCK, R. G. S.; SCHEFER, A. B.; MAGALHÃES, A.; FERREIRA, A. G.; DE SANCTIS, B.; FREITAS, J. C.; MIGOTTO, A. E.; HAJDU, E. 2000. *Quim. Nova*. 23, 594.

HABERMEHL, G.G & KREBS, H.C. 1999. Comparative Biochemical Studies on Sea Anemonies (*Anemonia sulcata*, *Metridium Senile*). International Society on Toxinology: European Meeting.

HANDAYANI, D., EDRADA, R. A., PROKSCH, P., WRAY, V., WITTE, L., VAN OFWEGEN, L. & KUNZMANN, A., 1997. New oxygenated sesquiterpenes from the Indonesian soft coral *Nephthea chabroliei*. *J. Nat. Prod.* 60: 716-718.

HERNANDEZ, I. L. C.; GODINHO, M. J. L.; MAGALHÃES, A.; SCHEFER, A. B.; FERREIRA, A. G.; BERLINCK, R. G. S. 2000. *J. Nat. Prod.* 63, 664.

KELECOM, A. 1997. *Ciência e Cultura*. 49, 321.

KELECOM, A. 1998. *J. Braz. Chem. Soc.* 9, 101.

LINDSAY, B.; ALMEIDA, A. M. P.; SMITH, C.; ROCHA, R. M.; BERLINCK, R. G. S.; IRELAND, C. M. 1999. *J. Nat. Prod.* 62, 1573.

MARQUES D., ESTEVES A.I, XAVIER J., ALMEIDA M., HUMANES M. 2006 Marine Sponge *Cliona celata* as a potential bioindicator .Eds. Alpoim M.C, Moraes P.V., Santos M.A., Cristovao A.J., Centeno J., Collery P. Metal Ions in Biology and Medicine, John Libbey Eurotext, Paris, vol 9: 451- 456.

MARQUES, D.; ALMEIDA, M.; XAVIER, J.; HUMANES, M. 2007 Biomarkers marine sponge- acetylcholinesterase in the sponge *Cliona celata* Porifera Research- Biodiversity, Innovation, Sustainability, accepted for publication.

MARQUES, D.; ESTEVES, A.I.; ALMEIDA, M.; XAVIER J.; HUMANES M. 2007 Superoxide dismutase in the marine sponge *Cliona celata*, accepted for publication in Marine Biology.

MARETIC, Z & RUSSELL, F.E. 1983. Stings by the Sea Anemone *Anemonia sulcata* in the Adriatic Sea. *Am.J.Trop.Med. Hyg.* 32(4). 891-896.

MARTINEZ, G; KOPEYAN, C; SCHWEITZ, H & LAZDUNSKI, M. 1977. Toxin III from *Anemonia sulcata*: Primary Structure. *FEBS Letters*. Vol. 84. No.2. 247-252.

NATÁLIO, F.; MARCÃO, S.; ALMEIDA, M.; DUARTE, C; LOPES, M.T.; HUMANES, M. 2003 Oxido-redutases em Demospongiae da costa portuguesa em "Ecotoxicologia e remoção de poluentes: estudos na Península Ibérica", 69-73, Edições Piaget.

NICOLAI, M.; ESTEVES, A.; ALMEIDA, M.; HUMANES, M. 2007 Haloperoxidase produced by the marine Sponge *Erylus discophorus*" Porifera Research-Biodiversity, Innovation, Sustainability, accepted for publication.

NOVAK, V; SKET, D; CANGAR, G & LEBEZ, D. 1973. Partial Purification of a Toxin from Tentacles of the Sea Anemone *Anemonia sulcata*. Toxicon. Vol 11, 445-447.

RACK, M; MEVES, H; BÉRESS, L & GRÜNHAGEN, H.H. 1983. Toxicon. Vol. 21. Nº.2. 231-237.

RAMOS , R.; GARCIA, E. 2007 Induction of mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes in the coral *Montastraea faveolata* on acute exposure to benzo(a)pyrene Comparative Biochemistry and physiology, Part C, 144, 348-355.

ROBERGE, M.; BERLINCK, R. G. S.; XU, L.; ANDERSON, H.; LIM, L. Y.; CURMAN, D.; STRINGER, C. M.; FRIEND, S. H.; DAVIES, P.; VINCENT, I.; HAGGARTY, S. J.; KELLY, M. T.; BRITTON, R.; PIERS, E.; ANDERSEN, R. J. 1998. *Cancer Res.* 58, 5701.

SAEKI, B. M.; GRANATO, A. C.; BERLINCK, R. G. S.; MAGALHÃES, A.; SCHEFER, A. B.; FERREIRA, A. G.; PINHEIRO, U. G.; HAJDU, E. 2002. *J. Nat. Prod.* 65, 796.

SAMMARCO, P. W. & COLL, J. C., 1992. Chemical adaptations in the Octocorallia: evolutionary considerations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 88: 93-104.

SAMMARCO, P. W., COLL, J.C. & LA BARRE, S. C., 1985. Competitive strategies of soft corals (Coelenterata: Octocorallia). II. Variable defensive response and susceptibility to scleractinian corals. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 91: 199-215.

SANCHEZ, J; BRUHN, T; ANEIROS, A; WACHTER, E & BERÉSS, L. 1996. A Simple Biochemical Method in the Search for Bioactive Polypeptides in a Sea Anemone (*Anemonia sulcata*). *Toxicon*. Vol. 34. No.11/12. 1361-1366.

TAZIEFF-DEPIERRE, F.G; CHOUCAVY, M; GOUDOU, D & METEZEAU, P. 1999. Action of Purified Toxins Isolated from the Scorpion and the *Anemonia sulcata* Venoms. International Society on Toxinology: European Meeting.

TESSERAUX, I & ALSEN, C. 1999. Comparison of Neurotoxic and Cardiotoxic Effects of Sea Anemone (*Anemonia sulcata*) Toxins in Mammals. International Society on Toxinology: European Meeting.

TORRES, Y. R.; BERLINCK, R. G. S.; NASCIMENTO, G. G. F.; FORTIER, S. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. 2002 A. *Toxicon*. 40, 885.

TORRES, Y. R.; BUGNI, T. S.; BERLINCK, R. G. S.; IRELAND, C. M.; MAGALHÃES, A.; FERREIRA, A. G.; ROCHA, R. M. 2002 B. *J. Org. Chem.* 67, 5429.

TORRES, Y.R.; BERLINCK, R. G. S.; MAGALHÃES, A.; SCHEFER, A. B.; FERREIRA, A. G.; HAJDU, E.; MURICY, G. 2000. *J. Nat. Prod.* 63, 1098.

TYTLER, E.M & DAVIES, P.S. 1986. The Budget of Photosynthetically derived energy in the *Anemonia sulcata* (Pennant) Symbiosis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 99. 257-269.

TYTLER, E.M & DAVIES, P.S. 1984. Photosynthetic Production and Respiratory Energy Expenditure in the Anemone *Anemonia sulcata* (Pennant). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 81. 73-86.

VILLATE, M.L; PÉREZ, M.D.F; ALFONSO, A.R.C; TAMAYO, E.M & MARTINEZ, B.C. 1998. Pesquisage de propiedades antiinflamatorias y analgésicas en extractos de origen marino de Cuba. *Revista Cubana Plant Med*, 3(2): 69-71.



Figura 1. Espécie utilizada para os testes de extracção química *Anemonia viridis* = *A. sulcata* (Forskål, 1775).



Figura 2. Áreas de Amostragem Norte(Viana do Castelo, Aguda), Centro (Estoril) e Sul (Sagres).



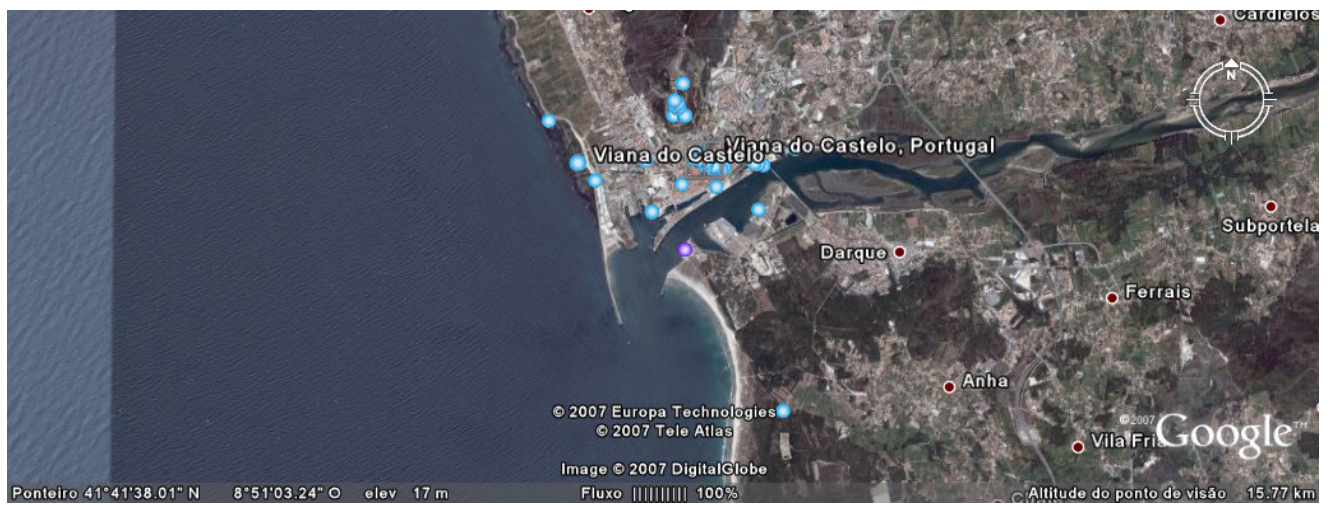


Figura 3. Localização geográfica espacial da Praia de Viana do Castelo (Praia Abrigada)



Figura 4. Praia de Viana do Castelo (Ponto de Amostragem 1- Costa Norte de Portugal)



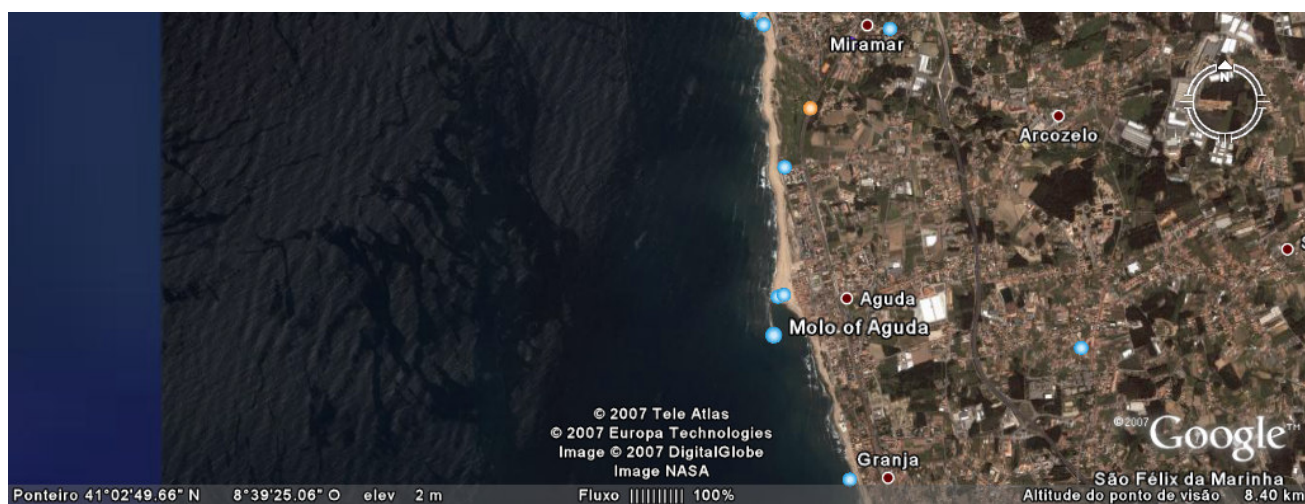


Figura 5. Localização geográfica espacial da Praia da Aguda (Porto), costa norte Portuguesa.



Figura 6. Praia da Aguda (Ponto 2-Costa Norte de Portugal)



Figura 7. Localização geográfica espacial da Praia de São Pedro do Estoril (costa centro Portuguesa)



Figura 8. Praia de São Pedro do Estoril, ponto amostragem da costa centro de Portugal.





Figura 9. Localização geográfica espacial da Praia do Tonel- costa sul Portuguesa.



Figura 10. Praia do Tonel (Sagres) ponto de amostragem Sul da costa Portuguesa.



Figura 11. Localização geográfica espacial da Cova do Sonho, ponto insular da Costa Portuguesa



Figura 12. Cova do Sonho (Ilhas Berlengas) ponto de amostragem insular da costa Portuguesa.

*Sagres	Estoril	*Aguda	*Viana do Castelo	Ilhas Berlengas	Ponto de Amostragem
0.49	11.54	30	44.77	1,4048	Peso inicial (gramas)
16.17	21.91	9.03	10.51		Peso final (gramas) (*frasco= 49.28)
					Nº de Elementos Revelados pela
2*	2*	1*	1**	1*	Nº de compostos na solução 1
8(6**)	4(1**)	3(1**)	4 (1**)	2	Nº de compostos na solução 2
2**	3*	1*	1(*)	6 (2**)	Nº de compostos na solução 3
4(1**)	3*	3*	2*	8 (1**)	Nº de compostos na solução 4
7**	2**	2**	2**	5 (2**)	Nº de compostos na solução 5
4 (1*3**)	4(3*1**)	4(3*1**)	4 (1**)	2	Nº de compostos na solução 6

Tabela 1: Resultados da cromatografia de camada fina, quantificação do número de compostos encontrados em diferentes concentrações de hexano para os extratos de éter de *Anemonia sulcata*.

\*Compostos visíveis ao ultravioleta

\*\* Compostos visíveis após revelador genérico

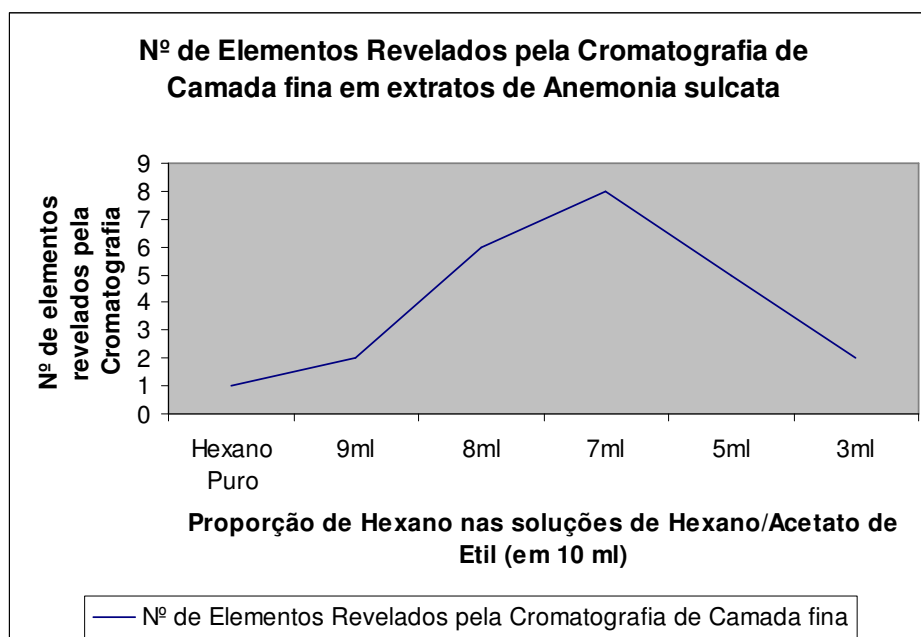


Figura 13. Número de elementos revelados pela cromatografia de camada fina em extratos de *Anemonia sulcata*, em diferentes concentrações de Hexano/Acetato de Etil (Ilhas Berlengas)

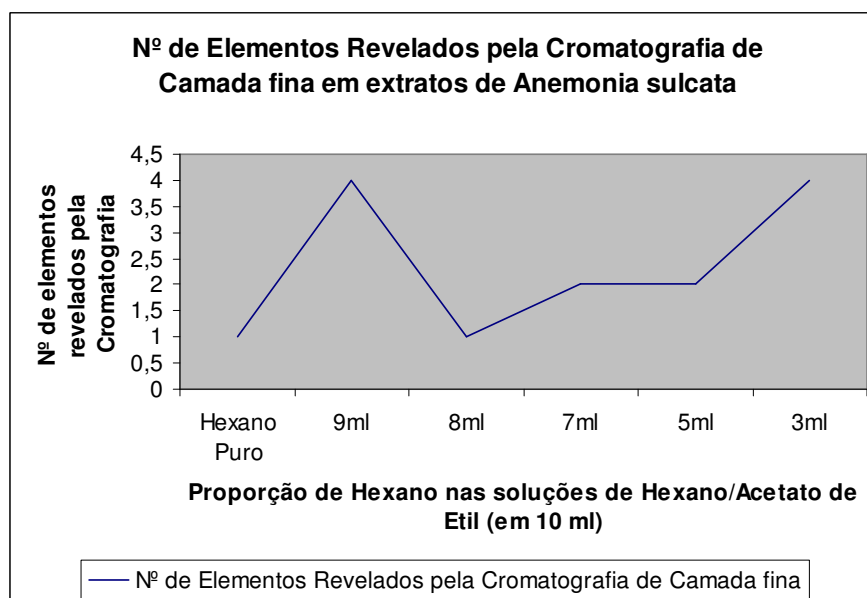


Figura 14: Número de elementos revelados pela cromatografia de camada fina em extratos de *Anemonia sulcata*, em diferentes concentrações de Hexano/Acetato de Etil (Viana do Castelo)

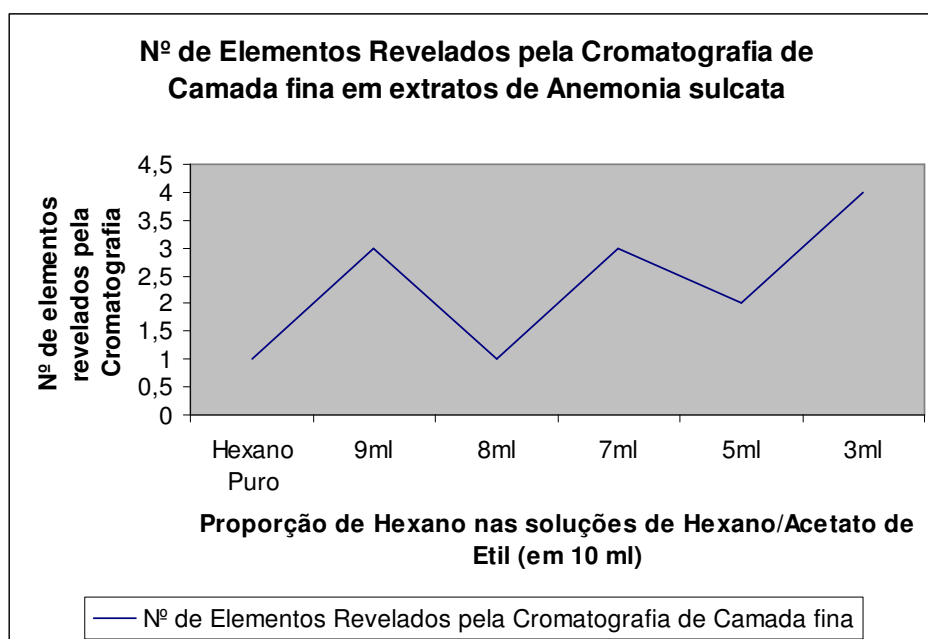


Figura 15: Número de elementos revelados pela cromatografia de camada fina em extratos de *Anemonia sulcata*, em diferentes concentrações de Hexano/Acetato de Etil (Aguda).

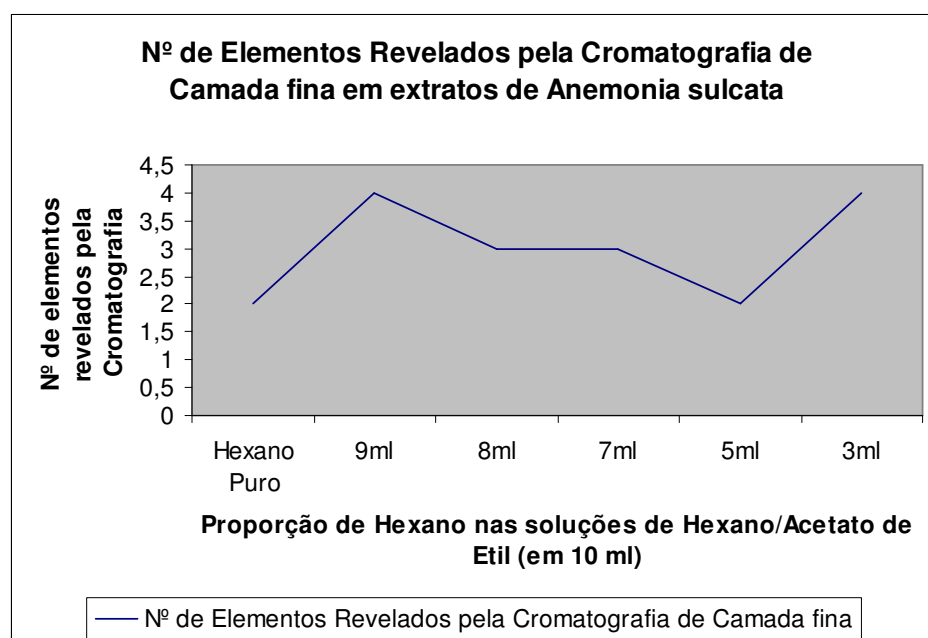


Figura 16: Número de elementos revelados pela cromatografia de camada fina em extratos de *Anemonia sulcata*, em diferentes concentrações de Hexano/Acetato de Etil (Estoril).

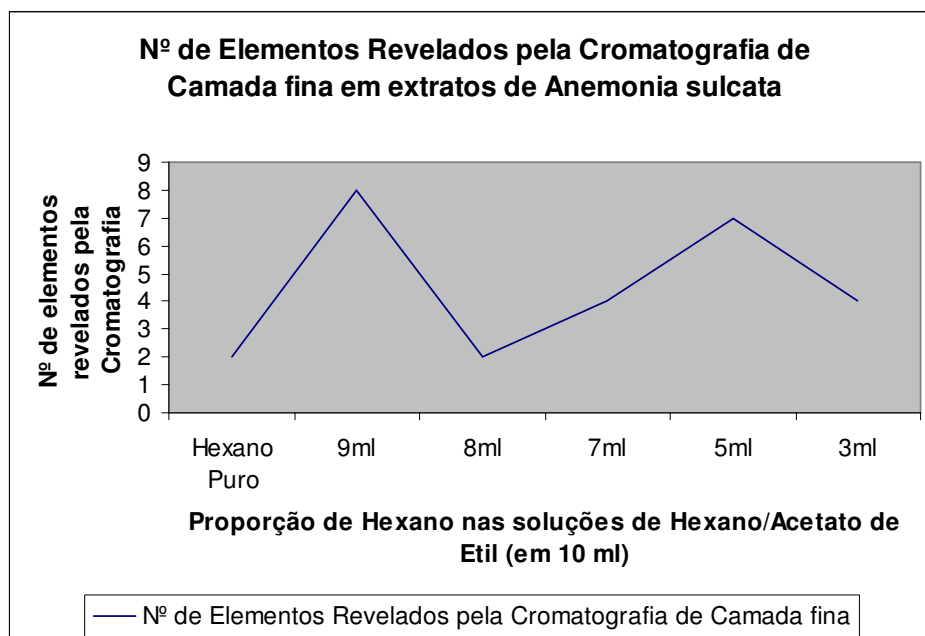


Figura 17: Número de elementos revelados pela cromatografia de camada fina em extratos de *Anemonia sulcata*, em diferentes concentrações de Hexano/Acetato de Etil (Sagres).



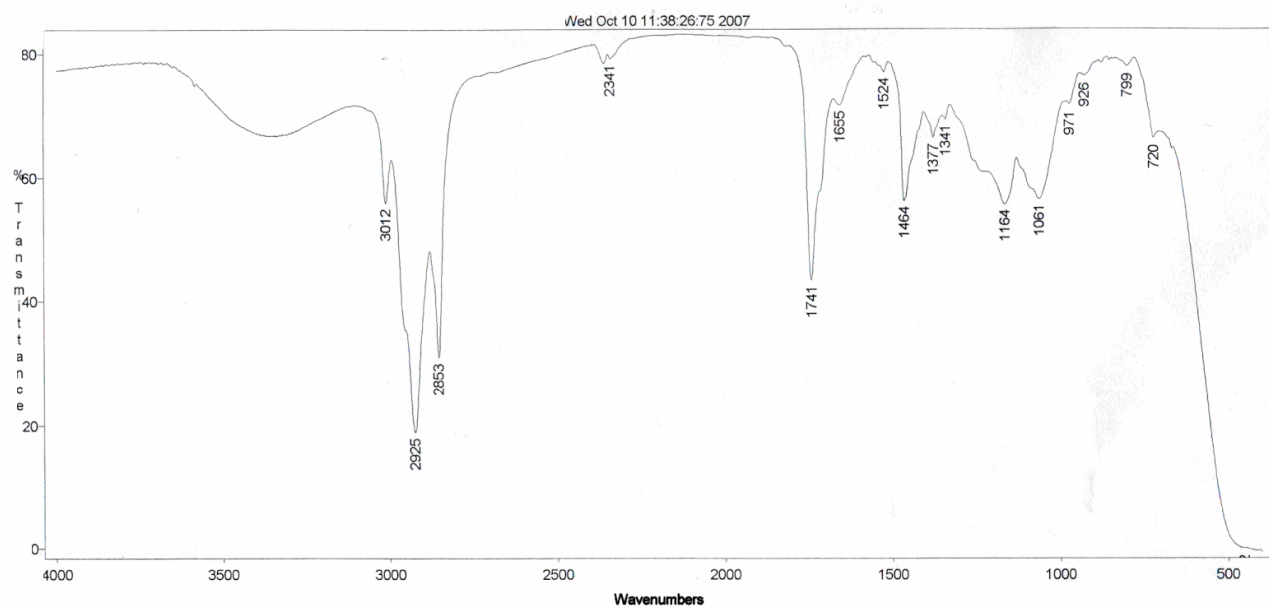


Figura 18. Infravermelho do extrato de *Anemonia sulcata* do ponto de Amostragem insular Ilhas Berlengas.

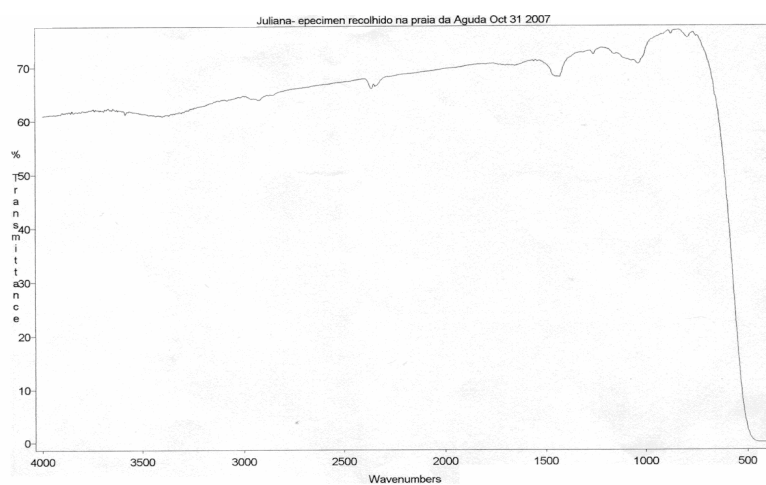


Figura 19 . Infravermelho do extrato de *Anemonia sulcata* do ponto de Amostragem Norte Aguda.

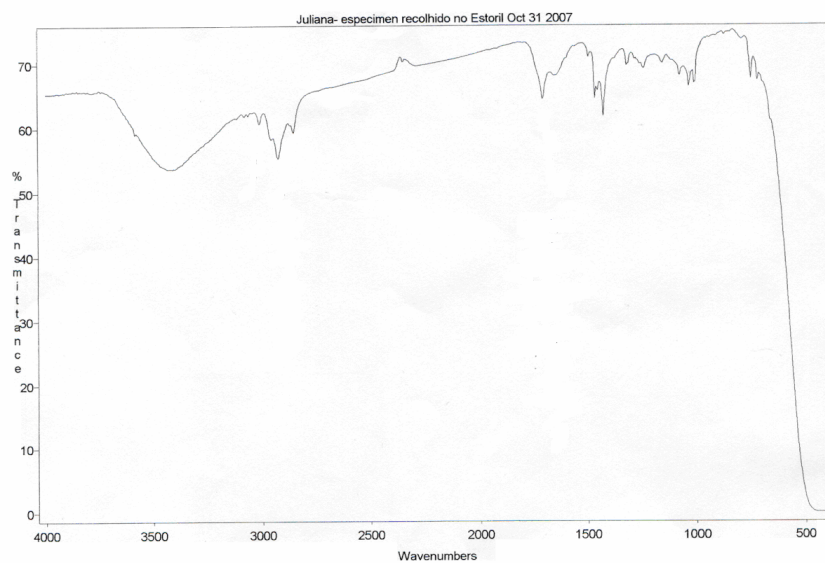


Figura 20 . Infravermelho do extrato de *Anemonia sulcata* do ponto de Amostragem Centro Estoril.

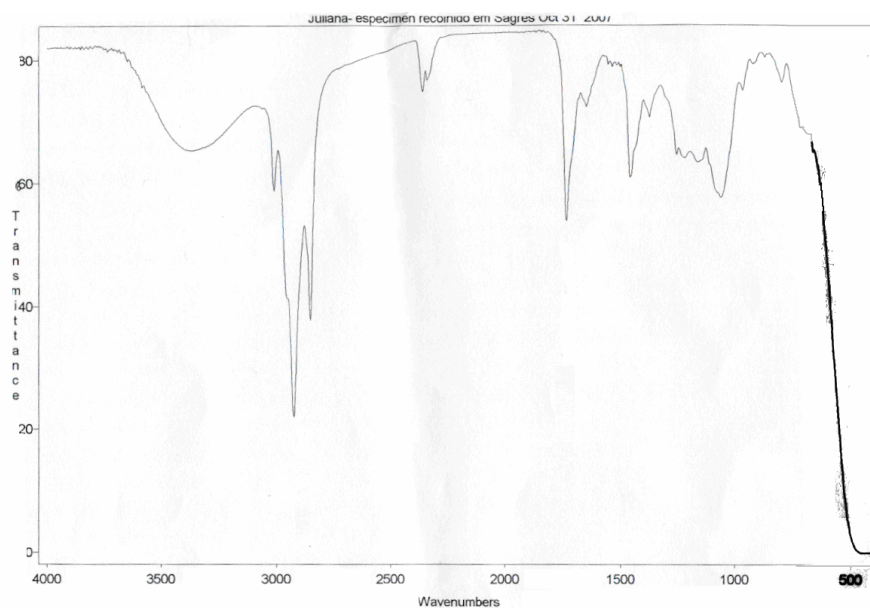


Figura 21 . Infravermelho do extrato de *Anemonia sulcata* do ponto de Amostragem Sul Sagres.

## **Estudo Taxonómico e Ecológico da espécie *Anemonia sulcata***

Phyllum cnidaria

Ordem Actiniaria

Classe Hexacorallia

Subclasse Anthozoa

Género *Anemonia*

Vivem das zonas subtidal até 23 centímetros sobre as pedras e por vezes, entre algas. Encontram-se em zonas muito iluminadas, distribuída do Mediterrâneo ao Atlântico (Costa Oeste da Escócia), Canal da Mancha, Costa Noroeste de Portugal. Possui base (pedúnculo) ligeiramente adesivo o qual fixa-se por sucção; coluna frequentemente ereta e base ampla.

Aproximadamente 170 tentáculos dispostos em círculos de 6 em 6, não totalmente retrátil. Possui hábito alimentar Carnívora, captando os alimentos através dos seus tentáculos. Reprodução asexuada cuja fase dominante é um grande pólipó. Coluna cinza, castanha ou verde e seus tentáculos com a ponta cor púrpura, duas linhas brancas da base à boca. Coluna: 10 cm de altura e tentáculos: 15 cm.

## ANEXO II

(ARTIGO À SUBMETER A REVISTA ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY)

### DETECÇÃO DA ACTIVIDADE DAS COLINESTERASES COMO BIOMARCADORES AMBIENTAIS EM *Anemonia sulcata* (Forskål, 1775) NA COSTA PORTUGUESA

Gadelha, J.R.<sup>1</sup>. ; Vieira, L.<sup>1,2</sup> ; Humanes, M.<sup>4</sup>. ; Guilhermino, L.<sup>2</sup>. ; Soares, A.M.V.M.<sup>1,3</sup>. & Morgado, F.<sup>1,3</sup>.

1-Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro. Campus Univeritário de Santiago, 3810. Aveiro, Portugal. [jrgadelha@ua.pt](mailto:jrgadelha@ua.pt); [fmorgado@ua.pt](mailto:fmorgado@ua.pt). fone : 234 370 786

2 CIMAR-LA/CIIMAR - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto, Laboratório de Ecotoxicologia, Rua dos Bragas, 289, 4050-123 Porto, Portugal

ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Departamento de Estudos de Populações, Laboratório de Ecotoxicologia, Lg. Prof. Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto, Portugal

3- CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

4- Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Cidade Universitária - Edifício C5, Campo Grande 1749-016. Lisboa.

## RESUMO

Os Biomarcadores têm sido amplamente utilizados para a avaliação da exposição e / ou de efeitos de contaminantes ambientais. Um dos mais frequentemente utilizados é a inibição da colinesterases (ChE), que são fortemente inibidos pelos organofosfatos e carbamatos de pesticidas. Biomonitoros tem sido utilizados a fim de desenvolver bases de extrapolação dos efeitos dos poluentes no ambiente. *Anemonia sulcata* tem uma ampla distribuição na costa Portuguesa e desempenha um papel ecológico fundamental no meio marinho aspectos que recomendam utilização desta espécie para posteriores estudos ecotoxicológicos como bioindicador ou biomonitor e

para estudos laboratoriais. O principal objectivo deste estudo consistiu em detectar actividade significativa da enzima colinesterase no tentacle e pedúnculo da anémona-do-mar *Anemonia sulcata*. Por outro lado, foram recolhidas amostras provenientes de três praias localizadas em pontos diferentes da costa Portuguesa, uma no Norte (Viana do Castelo), uma no centro (Praia da Aguda) e uma do sul (Praia do Tonel-Sagres), a fim de detectar diferenças espaciais na actividade das colinesterase. A determinação da actividade da colinesterase foi realizada de acordo com o método de Ellman *et al.*, (1961) adaptado para microplacas (Guilhermino *et al.*, 1996). Foi observada actividade significativa da enzima tanto no tentaculo como no pedúnculo, mas não foram observadas diferenças significativas entre tentaculo e pedúnculo. A actividade das colinesterases de *Anemonia sulcata* foi significativamente diferente nos três locais de amostragem. Os resultados revelaram que *Anemonia sulcata* é uma espécie sensível e adequado para funcionar como um biondicador e válida para os futuros estudos ecotoxicológicos laboratoriais.

## **PALAVRAS-CHAVES**

Biomarcadores, *Anemonia sulcata*, Actividade ChE, Pedúnculo, Tentáculo, Costa Portuguesa.

## **ABSTRACT**

Biomarkers have been widely used for the assessment of exposure and/or effects to environmental contaminants. One of the most frequently used biomarker is the inhibition of cholinesterases (ChE) which are strongly inhibited by organophosphate and carbamate pesticides. Biomonitoring has been used in order to develop basis of extrapolation of the effects of contaminants in the environment. *Anemonia sulcata* has a wide distribution in the Portuguese coast and plays important ecological key role in the marine environment that lead the use of this species for posterior ecotoxicological studies as bioindicator or biomonitoring and laboratorial studies. The main aim of this study is to detect significant cholinesterase activity in the tentacle and peduncle of the sea anemone *Anemonia sulcata*. In other hand, samples from three different located beaches on the Portuguese coast were taken, one in the north (Viana do Castelo), one in the centre (Praia da Aguda) and one from the south (Praia do Tonel-Sagres) in order to

detect spatial differences cholinesterase activity. The determination of ChE activity was carried out according to the Ellman *et al.*, method (1961) adapted to microplate (Guilhermino *et al.*, 1996). It was observed significant cholinesterase activity both in tentacle and peduncle, but no significant differences were observed between tentacle and peduncle. The cholinesterase activity on *Anemonia sulcata* from the three locations was significantly different. The results proved that *Anemonia sulcata* is a sensitive species suitable to act as a bioindicator and valid for future ecotoxicological laboratorial studies.

## KEY-WORDS

Biomarkers, *Anemonia sulcata*, ChE Activity, Peduncle, Tentacle, Portuguese Coast.

## INTRODUÇÃO

A detecção da actividade de colinesterases como biomarcadores ambientais tem sido desenvolvida com espécies padronizadas (espécies-chave), as quais apresentam elevada relevância ecológica, pois anulam os factores de incerteza de testes laboratoriais. As ChE são utilizadas como parâmetros indicativos de toxicidade neste tipo de ensaios, onde os resultados podem ser cruzados com outras componentes ou outros biomarcadores. Os biomarcadores têm sido utilizados como parâmetros medidos em tecidos de organismos (cérebro, fígado ou brânquias) ou nos seus sub-produtos (penas, pêlos, urina) que possam indicar anormalidades nos padrões de exposição e poluição por contaminantes. No entanto os efeitos individuais não podem ser extrapolados para toda a população, podendo apresentar baixa relevância, o que limita a sua utilização para avaliação do risco ecológico. Porém, se cruzados com informações e parâmetros ecológicos relevantes, poderão ser constituídas fortes bases para estes estudos.

A enzima chE tem sido usada extensamente como um biomarcador específico para pesticidas organofosforados e carbamatos. Entretanto, os estudos recentes indicam que pode também ser inibido por outros contaminadores ambientais tais como metais, surfactantes e componentes indeterminados de efluentes urbanos e do processamento do papel (Guilhermino *et al.*, 1998; Martinez-Tabche *et al.*, 1997; Payne *et al.*, 1996). Assim, um uso mais geral para este biomarcador foi proposto (Guilhermino *et al.*,

1998; Payne *et al.*, 1996). Nas últimas décadas, a ecotoxicologia teve maior interesse no uso dos biomarcadores para avaliar a toxicidade dos produtos químicos aos sistemas biológicos, particularmente em populações naturais.

A chE possui uma função responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina após a passagem do impulso nervoso, vários estudos têm indicado que ChE podem ser inibidas por contaminantes ambientais (insecticidas organofosforados e carbamatos, metais, detergentes e produtos petrolíferos) sendo assim uma importante ferramenta da avaliação do risco ecológico. A enzima colinesterase foi utilizada neste estudo como ferramenta de detecção da toxicidade ambiental procurando adaptar os métodos a organismos estruturalmente mais simples e portanto, com menor grau de especialização do seu sistema nervoso. Apesar da sua simplicidade estrutural. Os cnidários possuem um sistema de protecção de alguma complexidade devido à presença de glândulas secretoras de toxinas urticantes. A espécie utilizada para este estudo *Anemonia sulcata*, apresenta estruturas denominadas cnidocistos, as quais secretam substância tóxicas que possuem actividade imunodepressiva e neurodepressivas (cardioarritmia, diminui a pressão arterial) (NOVAK AND SKET, 1973 in CANKAR AND LEBEZ, 2002).

Os objectivos da realização deste estudo foi o de verificar, por um lado, actividades significativas de ChE (colinesterase) em tentáculo e pedúnculo de anémonas-do-mar da espécie *Anemonia sulcata* e, por outro lado, verificar diferenças de actividade espaciais significativas em diferentes locais de amostragem ao longo da Costa Portuguesa. Especificamente procurou-se testar uma nova espécie *Anemonia sulcata*, um organismo estruturalmente simples, para testes de toxicidade ambiental. As hipóteses testadas foram : haverá a presença de Colinesterases mensurável em *Anemonia sulcata* ? Teriam as anémonas-do-mar estruturas responsáveis pela acção de enzimas de resposta aos estímulos extrínsecos ? Sendo *Anemonia sulcata* caracterizada como espécie produtora de compostos tóxicos, será uma espécie adequada para ser utilizada em testes ecotoxicológicos ? Haverá diferenças de actividades em diferentes partes do corpo do organismo ? Haverá diferenças na detecção de actividades de *Anemonia sulcata* entre as diferentes áreas de amostragem ?

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparação do material biológico

O organismo alvo neste estudo foi uma anémone-do-mar *Anemonia sulcata* (figura 1), capturada em três diferentes pontos da Costa noroeste de Portugal: norte - Viana do Castelo (41°41'35,16"N, 8°51'4,33"O), centro- Praia da Aguda- Porto (41° 2'52,35"N, 8°39'13,28"O) e sul- Praia do Tonel- Sagres (38°59'46,49"N, 8°57'1,43"O) (figura 2). Após a colheita, os organismos foram acondicionados em malas térmicas, com água do mar, e transportados de imediato para o laboratório. No laboratório as anémonas foram individualizadas e lavadas com água destilada, para retirada de detritos e posteriormente congelados a -80°C.

### Quantificação da actividade enzimática

Para a realização do bioensaio, 7 organismos foram dissecados, em gelo, isolando tentáculos e pedúnculos, por ponto de amostragem. Aproximadamente a mesma quantidade de ambos os tecidos foi isolada para *eppendorffs* com uma solução tampão fosfato (0.1 M, pH 7.2) adequada para a quantificação da actividade das colinesterases (ChE). Os tecidos foram, então, homogeneizados na solução tampão e centrifugados (Aparelho Centifuge Eppendorf, modelo 5810R) a durante 3 minutos a 3300g. Finalmente os sobrenatantes foram recolhidos para novos *eppendorffs* e mantidos em gelo. A actividade das colinesterases foi determinada de acordo com o método descrito por Ellman *et al.* (1960) adaptado à microplaca por Guilhermino *et al.* (1996), com pequenas adaptações, usando um leitor de microplacas (Labsystems, modelo Multiskan EX).



## **Análise estatística**

A análise estatística foi processada utilizando o programa de software SPSS<sup>®</sup> v. 14. A comparação das actividades enzimáticas ao longo dos diferentes locais de amostragem foi realizada utilizando uma análise de variâncias (*one-way ANOVA*), seguida de um teste de Tukey (*HSD*) para verificar diferenças espaciais (Zar, 1996). Foi também realizado um teste de *Dunnett* para verificar diferenças significativas entre os tecidos para cada local. Para a actividade calculada em cada local, a normalidade dos dados foi testada (teste de normalidade *Kolmogrov-Smirnov*) e a homogeneidade das variâncias verificada (teste de *Barlett*). (Zar, 1996).

## **RESULTADOS**

### **Actividades enzimáticas**

Respondendo às hipóteses testadas neste trabalho foi detectada a presença mensurável de ChE em *Anemonia sulcata*, o qual se mostrou como um organismo potencialmente bioindicador de contaminação ambiental. Sabendo-se que as actividades da ChE se encontram descritas para muitas outras espécies, estes resultados adquirem uma importância como bioindicador ecológico. De acordo com os resultados da Tabela 1, não há diferenças significantes na actividade de ChE nos diferentes tecidos (tentáculos e pedúnculos). Porém foram observadas diferenças significantes na actividade de ChE nas amostras das diferentes áreas de amostragem da costa Portuguesa.

Os resultados da actividade das ChE nos tentáculos e pedúnculo dos organismos capturados ao longo dos 3 locais de amostragem estão apresentados na Fig. 3. O teste paramétrico *One-way ANOVA* revelou diferenças significativas entre locais de amostragem para as actividades das ChE nos tentáculos ( $F_{(2, 18)} = 81.7466$ ,  $p \leq 0.05$ ) e no pedúnculo ( $F_{(2, 18)} = 86.0003$ ,  $p \leq 0.05$ ). Com a excepção da Aguda (-4.07%), a actividade enzimática foi ligeiramente superior no pedúnculo em Viana do Castelo e Sagres (15.27 e 5.47%, respectivamente) (Fig. 3A e 3B). No entanto, o teste de *Dunnett* não revelou resultados significativos entre os tecidos em qualquer dos locais de amostragem ( $p > 0.05$ ). A actividade das ChE das anémonas capturadas em Sagres foi

significativamente superior à dos restantes sítios de amostragem em ambos os tecidos (3.34 e 36.62 nmol/min/mg proteína, respectivamente.)( Figs. 3A e 3B). Para o local de amostragem sul (Sagres), foram obtidos maiores actividades significativas em ambos os tecidos.

## DISCUSSÃO

O facto de não haverem diferenças significativas na actividade da ChE entre os tecidos (tentáculo e pedúnculo) pode ser explicado pelo facto deste organismo possuir um sistema nervoso difuso, não tendo sido detectado diferenças de actividade nestes constituintes. Segundo Monteiro *et al.* (2000), as actividades das ChE apresentam variações sazonais, facto este que vem corroborar a não existência de actividade nos diferentes tecidos. Estudos sazonais posteriores poderão contribuir com mais informações acerca destes aspectos.

O aumento da actividade das ChE das amostras de Sagres podem ser devidas à sua localização geográfica caracterizada como zona exposta (recebe influência direta das correntes oceânicas) sendo portanto, local com hidrodinamismo intenso, o que revela diferenças de exposição das diferentes áreas de amostragem da costa portuguesa. Estudos anteriores têm demonstrado que áreas com maior hidrodinamismo, apresentam maior actividade de ChE.

Nos últimos anos, actividade das ChE tem sido utilizada como biomarcador em estudos ambientais, como por exemplo em moluscos (Moreira., 2005) e peixes (Van der Oost *et al.* 2003). No entanto, a actividade desta enzima como biomarcador em estudos de monitorização ambiental utilizando a presente espécie, não se encontra descrita na literatura. A actividade das ChE podem estar relacionadas com o habitat em que se encontram os organismos estudados, visto que esta é uma espécie que se encontra enterrada no sedimento (local de amostragem centro- Praia da Aguda) ou incrustadas nas rochas isoladas (local de amostragem sul- Sagres). O facto desta espécie ser um organismo filtrador, ou seja, a sua localização pode estar relacionada com a riqueza de matéria orgânica particulada.

## CONCLUSÃO

No presente estudo, foram demonstradas diferenças significativas de actividade de ChE em *Anemonia sulcata* na costa portuguesa. A espécie escolhida para este estudo demonstrou ser uma ferramenta útil para a detecção de contaminação ambiental, uma vez que, foram detectadas diferenças na actividade de ChE em diferentes áreas de amostragem associados à diferentes níveis de contaminação. Os resultados permitem-nos tirar ilacções a cerca de actividades ecológicas, tais como agentes forçadores extrínsecos com a acção das ChE. Sendo este estudo ecológico preliminar, uma importante ferramenta para estudos posteriores de biomonitorização ecológica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARATA, C.; BAIRD, D.J.; SOARES, A.M.V.M AND GUILHERMINO, L. 2001. Biochemical Factors Contributing to Response Variation among Resistant and Sensitive Clones of *Daphnia magna* Straus Exposed to Ethyl parathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 49, 155- 163.

BERESS, L. 1982. Biologically active compounds from Coelenterates. *Pure and Appl. Chem.* Vol.54. No.10, pp. 1981-1994.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein- Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

DIAMANTINO, T.C.; GUILHERMINO, L.; ALMEIDA, E AND SOARES, A.M.V.M. 2000. Toxicity of Sodium Molybdate and Sodium Dichromate to *Daphnia magna* Straus Evaluated in Acute, Chronic, and Acetylcholinesterase Inhibition Tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 45, 253-259.

GUILHERMINO, L., DIAMANTINO, T. C., RIBEIRO, R., GONÇALVES, F. & SOARES, A. M. V. M., 1997, Suitability of test media containing EDTA for the

evaluation of acute toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 38: 292-295.

GUILHERMINO, L; BARROS, P; SILVA, M.C; SOARES, A.M.V.M. 1998. Should the Use of Inhibition of Cholinesterases as a Specific Biomarker for Organophosphate and Carbamate Pesticides be Questioned? *Biomarkers*. Vol. 3. 157-163.

HABIG, W.H. ; PABST, J.M AND JAKOBY, W.B. 1974. Glutathione S-Transferase. The first step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 249, No.22, pp. 7130-7139.

LIMA, I. ; MOREIRA, S.M. ; OSTEN, J.R.V. ; SOARES, A.M.V.M AND GUILHERMINO, L. 2007. Biochemical Responses of the Marine Mussel *Mytilus galloprovincialis* to Petrochemical Environmental Contamination along the North-western Coast of Portugal. *Chemosphere*. 66, 1230-1242.

MARTÍNEZ-TABCHE, L; MUELLER , M., NÁJERA, J.B.P .1997. Estudio sobre el Tratamiento de Aguas Residuales Industriales Altamente Concentradas en Metales Pesados Bajo Aglomeración Esférica. *Sociedade Química do México*.

MONTEIRO, M.; QUINTANEIRO, C.; NOGUEIRA, A.J.A.; MORGADO, F.; SOARES, A.M.V.M AND GUILHERMINO, L. 2007. Impact of Chemical Exposure on the Fish *Pomatoschistus microps* (Krøyer, 1838) in Estuaries of the Portuguese Northwest Coast. *Chemosphere*. 66, 514-522.

MOREIRA, S.M., GUILHERMINO, L., 2005. The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest Portuguese coast. *Environ. Monit. Assess.* 105, 309–325.

MOREIRA, S.M., MOREIRA DOS SANTOS, M., RIBEIRO, R., GUILHERMINO, L., 2004. The 'Coral Bulker' fuel oil spill on the North coast of Portugal: spatial and temporal biomarker responses in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology* 13, 619–630.

NOVAK, V AND SKET, D. 1973. Partial purification of a toxin from tentacles of the sea anemone *Anemonia sulcata* in CANKAR, G AND LEBEZ, D. 2002. *Toxicon*. Vol. 11. Issue5, 411-417.

PAYNE, J.F; MATHIEU, A; MELVIN, W & FANCEY, L.L. 1996. Acetylcholinesterase, and old Biomarker with a new Future? Field Trials in Association with two Urban Rivers and Paper Mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 23. 225-231.

SANCHEZ, J.; BRUHN, T.; ANEIROS, A.; WACHTER, E AND BÉRESS, L. 1996. A Simple Biochemical Method in the Search for Bioactive Polypeptides in a Sea Anemone (*Anemonia sulcata*). *Toxicon*. Vol. 34. No. 11/12, 1361-1366.

VAN DER OOST, R; BEYER, J & VERMEULEN, N.P.E. 2003. Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: a Review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13. 57-149.



Figura 1. Espécie-alvo Anémoma-do-mar *Anemonia sulcata* (Forskål, 1775).



Figura 2. Áreas de Amostragem Norte e Sul da Costa Portuguesa (Norte- Viana do Castelo, Aguda e Sul- Sagres)

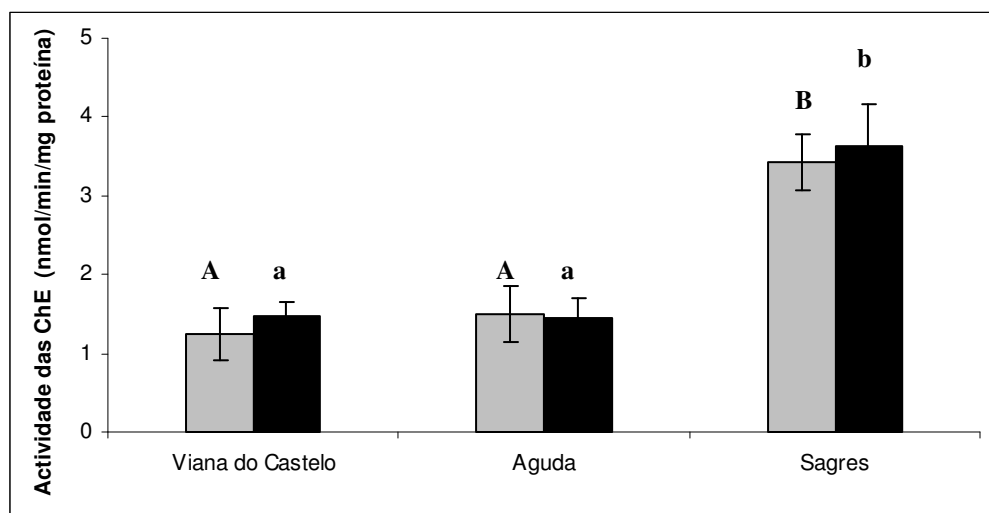


Figura 3. Parâmetros bioquímicos analisados em amostras de *Anemonia sulcata* coletadas de 3 áreas de amostragens ao longo da costa Portuguesa. São apresentados valores médios  $\pm$  desvio padrão ( $n = 7$ ) da actividade de ChE ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), Letras diferentes identificam diferenças significativas entre locais de amostragem, através do teste Tukey (honestly significant difference multiple-comparison test  $p \leq 0.05$ ). Letras minúsculas indicaram diferenças nos tecidos do tentáculo (a,b) e letras maiúsculas indicaram diferenças no pedúnculo (A, B).

(ARTIGO À SUBMETER A REVISTA CHEMOSPHERE)

**GLUTADIONA S-TRANSFERASES PODERÁ SER UM BIOMARCADOR  
AMBIENTAL na Anémona-do-mar *Anemonia sulcata*, (Forskål, 1775)?**

**Gadelha, J.R<sup>1</sup>. ; Vieira, L<sup>1,2</sup>. ; Humanes, M. ; Guilhermino, L<sup>2</sup>. ; Soares, A.M.V.M  
& Morgado, F<sup>1,3</sup>.**

1- Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro. Campus Univeritário de Santiago, 3810. Aveiro, Portugal. [jrgadelha@ua.pt](mailto:jrgadelha@ua.pt);

[fmorgado@ua.pt](mailto:fmorgado@ua.pt). fone :

2- CIMAR-LA/CIIMAR - Intermédia Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto, Laboratório de  
Ecotoxicologia, Rua dos Bragas, 289, 4050-123 Porto, Portugal

ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Departamento de Estudos de Populações,  
Laboratório de Ecotoxicologia, Lg. Prof. Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto, Portugal

3- CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

**RESUMO**

O desenvolvimento de biomarcadores baseado no estudo das respostas biológicas dos organismos a poluentes tem fornecido ferramentas bioquímicas essenciais para o estudo das espécies relevantes que podem ser bioindicadoras de contaminação ambiental. Biomonitorios têm utilizados a fim de desenvolver bases de extrapolação dos efeitos dos poluentes no ambiente. *Anemonia sulcata* apresenta uma ampla distribuição na costa Portuguesa e desempenha um papel ecológico fundamental no meio marinho. Estes aspectos tornam a utilização desta espécie aconselhável para estudos ecotoxicológicos posteriores como bioindicador ou biomonitor e em estudos laboratoriais. O principal objectivo deste estudo consistiu em detectar actividades significativas de Glutadiona-S-Transferase (GST) no tentáculo e pedúnculo do anémona-do-mar *Anemonia sulcata*. Por outro lado, foram recolhidas amostras provenientes de três praias localizadas em pontos diferentes da costa Portuguesa, uma no Norte (Viana do Castelo), uma no centro (Praia da Aguda) e uma do sul (Praia do Tonel-Sagres), a fim de detectar diferenças espaciais na actividade da GST actividade. A actividade da GST foi medido usando a metodologia geral descrita por Habig e Jakoby (1981)



adaptado para microplacas leitor (Frasco e Guilhermino, 2002). Foi observada actividade significativa de GST no tentaculo e no pedúnculo, mas não foram observadas diferenças significativas entre tentaculo e pedúnculo. A actividade da GST de *Anemonia sulcata* da praia de Sagres, situada no sul da costa Português foi significativamente diferente dos outros dois locais de amostragem (Praia de Aguda e Viana do Castelo), situados no centro e norte da costa Portuguesa, respectivamente. Os resultados revelaram que *Anemonia sulcata* é uma espécie sensível e adequada para funcionar como um biondicator sendo válida para as futuros estudos ecotoxicológicos laboratoriais.

## **PALAVRAS-CHAVES**

Biomarcadores, Anémona, Pedúnculo, Tentáculo, Costa Portuguesa.

## **ABSTRACT**

The development of biomarkers based on the study of biological responses of organisms to pollutants has provided the biochemical tools essential to the study of relevant species that may be bioindicators of environmental contamination. Biomonitoring has been used in order to develop basis of extrapolation of the effects of contaminants in the environment. *Anemonia sulcata* has a wide distribution in the Portuguese coast and plays important ecological key role in the marine environment that lead the use of this species for posterior ecotoxicological studies as bioindicator or biomonitoring and laboratorial studies. The main aim of this study is to detect significant activity of glutathione s-transferase (GST) in the tentacle and peduncle of the sea anemone *Anemonia sulcata*. In other hand, samples from three different located beaches on the Portuguese coast were taken, one in the north (Viana do Castelo), one in the centre (Praia da Aguda) and one from the south (Sagres) in order to detect spatial differences GST activity. GST activity was measured following the general methodology described by Habig and Jakoby (1981) adapted to microplate reader (Frasco and Guilhermino, 2002). It was observed significant GST activity both in tentacle and peduncle, but no significant differences were observed between tentacle and peduncle. The GST activity on *Anemonia sulcata* from the beach of Sagres, located in the south of the Portuguese coast was significantly different from the other two sampling locations (Praia da Aguda and Viana do Castelo) located in the centre and north, respectively. The results proved

that *Anemonia sulcata* is a sensitive species suitable to act as a bioindicator and valid for future ecotoxicological laboratory studies.

## KEY-WORDS

Biomarkers, Anemone, Peduncle, Tentacle, Portuguese Coast.

## INTRODUÇÃO

As GST são consideradas uma família de enzimas muito importantes nos processos de detoxificação de xenobióticos de compostos endógenos, uma vez que catalizam a conjugação dos compostos electrofílicos, resultantes da fase I de biotransformação, com a glutathione (GSH) (Fitzpatrick *et al.*, 1995 In Lima *et al.*, 2007).. A GSH tem um papel muito importante na detoxificação dos compostos electrofílicos e na prevenção do stress oxidativo (Hasspieler *et al.*, 1994). Nos últimos anos, actividade das GST tem sido utilizada como biomarcador em estudos ambientais, como por exemplo em moluscos (Moreira., 2004; 2005) e peixes (Van der Oost *et al.*, 2003). No entanto, a actividade desta enzima como biomarcador em estudos de monitorização ambiental utilizando a presente espécie, não se encontra descrita na literatura. As GSTs têm sido muito utilizadas como biomarcadores em estudos de campo com vertebrados e invertebrados (Monteiro *et al.*, 2007; Moreira e Guilhermino, 2005; Castro *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2004; Lenartova *et al.*, 1997). Tem sido evidenciado as potencialidades da GST como indicadores sensíveis à exposição a vários tipos de fontes de poluição, mas sobretudo a óleos e combustíveis (Moreira, *et al.* 2004).

O presente estudo vem propor a utilização de GST (Glutathione S-Transferase) como biomarcador ambiental, utilizando como ferramenta a anémone-do-mar *Anemonia sulcata* seguindo os critérios propostos por Van der Oost (2003) para a confiabilidade de utilização de algumas enzimas em estudos de avaliação de poluição ambiental. Assim, os ensaios quantitativos para os biomarcadores devem ser fiáveis (com garantia de qualidade (QA), relativamente baratos e de fácil execução; o biomarcador resposta deve ser sensível às exposições aos poluentes e (ou) efeitos a fim de servir como um parâmetro de alerta; a base de dados do biomarcador deve ser bem definida, a fim de distinguir entre variabilidade natural (ruído) e contaminante estresse - induzida (sinal); o

impacto dos factores para o biomarcador resposta deve ser bem estabelecida; subjacentes ao mecanismo das relações entre biomarcador resposta e poluente exposição (dose e tempo) deve ser estabelecida; a importância toxicológica significativa do biomarcador, por exemplo, a relação entre as suas respostas e os impactos ao organismo (longo prazo), devem ser estabelecidos. Todos estes parâmetros de avaliação foram, no entanto, mais tarde reformulados de Stegeman *et al.* (1992).

Especificamente este estudo teve como objectivos detectar actividade significativa de GST (Glutadiona-S-transferase) em anémonas-do-mar *Anemonia sulcata*. Por outro lado, utilizar essa informação para a interpretação ambiental em diferentes locais de amostragem da Costa Portuguesa de modo a verificar diferenças espaciais significativas. Procurou-se testar uma nova espécie *Anemonia sulcata*, um organismo estruturalmente simples, para testes de toxicidade ambiental. As hipóteses testadas foram: Teriam as anémonas-do-mar estruturas responsáveis pela acção de enzimas de defesa aos estímulos extrínsecos? Uma vez que *Anemonia sulcata* é caracterizada como espécie produtora de compostos tóxicos, será esta uma boa espécie para ser utilizada em testes ecotoxicológicos? Haverá diferenças nos compostos produzidos por *Anemonia sulcata* entre as diferentes áreas de amostragem?

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparação do material biológico

No presente estudo, foi seleccionada uma anémona-do-mar *Anemonia sulcata* (Fig. 1). Este espécime foi capturado em três diferentes pontos da Costa noroeste de Portugal: norte - Viana do Castelo (41°41'35,16"N, 8°51'4,33"O), intermédia – Praia da Aguda (41° 2'52,35"N, 8°39'13,28"O) e sul- Praia do Tonal-Sagres(38°59'46,49"N, 8°57'1,43"O) (figura 2). Após a colheita, os organismos foram acondicionados em malas térmicas, com água do mar, e transportados de imediato para o laboratório. No laboratório as anémonas foram individualizadas e lavadas com água destilada, para retirada de detritos e posteriormente congelados a -80°C.

### Quantificação da actividade enzimática

Para a quantificação da actividade da GST, 7 organismos foram dissecados, isolando tentáculos e pedúnculos, por ponto de amostragem. Durante este processo, as amostras foram sempre mantidas em gelo. Aproximadamente a mesma quantidade de ambos os tecidos foi isolada para *eppendorffs* com uma solução tampão fosfato (0.1 M, pH 6.5) adequada para a quantificação da actividade das GST. Os tecidos foram, posteriormente homogeneizados na solução tampão e centrifugados a durante 30 minutos a 9000g, utilizando uma centrífuga Eppendorf, modelo 5810R. Finalmente a fracção sobrenadante foi recolhida para novos *eppendorffs*, e estes mantidos em gelo. A actividade das GST foi determinada de acordo com o método descrito por Habig *et al.* (1974) adaptado à microplaca por Frasco and Guilhermino (2002), com pequenas adaptações, usando um leitor de microplacas Labsystems, modelo Multiskan EX.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi processada utilizando o software SPSS<sup>®</sup> v. 14. Para a actividade calculada em cada local, a normalidade dos dados foi testada (teste de normalidade *Kolmogrov-Smirnov*) e a homogeneidade das variâncias verificada (teste de *Barlett*) (Zar, 1996). A comparação das actividades enzimáticas ao longo dos diferentes locais de amostragem foi realizada utilizando uma análise de variâncias (*one-way ANOVA*), seguida de um teste de Tukey (*HSD*) para detectar diferenças entre os locais de amostras (Zar, 1996). Foi também realizado um teste de *Dunett* para verificar diferenças significativas entre os tecidos para cada local.

## **RESULTADOS**

Os resultados da actividade das GST nos tentáculos e pedúnculo dos espécimes de *Anemonia sulcata* capturados ao longo dos 3 locais de amostragem estão apresentados na Fig. 3. O teste paramétrico *One-way ANOVA* revelou diferenças significativas entre locais de amostragem para as actividades das GST nos tentáculos ( $F_{(2, 18)} = 63.7327, p \leq 0.05$ ) e no pedúnculo ( $F_{(2, 18)} = 48.0723, p \leq 0.05$ ). A actividade calculada em ambos os tecidos, na Aguda, foi significativamente mais elevada (2.29 62nmol/min/mg proteína nos tentáculos e 2.12 62nmol/min/mg proteína no pedúnculo) que nos restantes locais. Os organismos capturados em Sagres apresentaram a mais

baixa actividade enzimática dos 3 locais estudados. Com a excepção da Aguda (-8.06%), a actividade enzimática foi ligeiramente superior no pedúnculo em Viana do Castelo e Sagres (4.36 e 3.66%, respectivamente).

## DISCUSSÃO

Os resultados observados mostraram que de acordo com as hipóteses testadas, foram detectados níveis mensuráveis da actividade da GST (Glutathione S-transferase) em *Anemonia sulcata*. Entre os dois tipos de tecidos testados (pedúnculo e tentáculo) não houve diferenças significativas na actividade enzimática. Houve diferenças significativas de actividade da GST entre os diferentes pontos de amostragem, verificando-se que as amostras da Praia da Aguda apresentaram maior actividade do que as amostras de Sagres. Estes resultados coincidem em ordem inversa com os resultados obtidos para tecidos de *Anemonia sulcata* testadas com ChE, tendo-se então observado que as amostras de Sagres apresentaram maior actividade para a ChE (Gadelha *et al.*, 2007a). Os menores valores de actividade da GST nas amostras de Sagres, podem ter sido devidos a uma resposta da actividade enzimática com os agentes forçadores externos, hidrodinâmicos e físico-químicos tais como correntes, temperatura e salinidade diferentes entre os ambientes marinhos testados. Os resultados reflectiram também a sensibilidade da actividade enzimática para locais sujeitos a maior intensidade de contaminação ambiental sendo maior a actividade da GST nesses locais, refletindo uma maior resposta por parte dos agentes detoxificativos (FITZPATRICK *et al.*, 1995; LENARTOVA *et al.*, 1997; MOREIRA & GUILHERMINO, 2005).

O presente estudo veio demonstrar que a espécie *Anemonia sulcata* apresentou resultados relevantes em relação à actividade enzimática das GSTs, o que é indicador da utilização desta espécie como ferramenta de detecção de contaminação ambiental. Estudos anteriores com *Anemonia sulcata* mostram que esta espécie possui mecanismos de acção e protecção ao ataque por predadores, pois já foram encontradas cinco diferentes toxinas: ATX I, II, III, IV e V, inibidores polivalentes da protease, um inibidor da elastase, dois polipeptídeos depressivos da pressão sanguínea e muito recentemente os peptídeos que inibem o competidor <sup>125</sup>I-dendrotoxina às membranas cerebrais e obstruem os canais sensíveis de K<sup>+</sup>, em ratos (BERESS, 1982; SANCHEZ. *et al.*, 1996; NOVAK & SKET, 1973).

As diferenças espaciais observadas na actividade da GST refletem diferentes níveis de contaminação dos locais de amostragem, validando a associação da actividade desta enzima com níveis de poluição. O local de Amostragem Norte (Viana do Castelo), em 2000 foi afectado severamente por um derramamento de óleo do Navio “Coral Bulker (Moreira *et al.*, 2004), situada na foz do rio Lima, e é sujeito continuamente à contaminação petroquímica com a actividade comercial e pesca de mexilhões (Lima *et al.*, 2007). Esta área apresentou os níveis intermediários em relação aos outros dois pontos (centro-Praia da Aguda e Sul-Sagres) na actividade das GST. Foi observada uma relação inversa, quanto a actividade de ChE e GST, resultado este também descrito por outros autores quer em estudos laboratoriais, quer em estudos de campo.

## **CONCLUSÃO**

Pode então concluir-se no presente estudo que a espécie *Anemonia sulcata* é uma ferramenta de estudos válida de avaliação de contaminação ambiental, uma vez que foram detectadas diferenças significativas de actividade da GST nos seus tecidos e também nas diferentes áreas de amostragem testadas ao longo da costa noroeste portuguesa.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

CASTRO, B.B., SOBRAL, O., GUILHERMINO, L., RIBEIRO, R., 2004. An in situ bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology* 13, 667–681.

FITZPATRICK, P.J., SHEEHAN, D., LIVINGSTONE, D.R., 1995. Studies on Isoenzymes of Glutathione S-transferase in the Digestive Gland of *Mytilus galloprovincialis* with Exposure to Pollution. *Mar. Environ. Res.* 39, 241–244 In LIMA, I. ; MOREIRA, S.M. ; OSTEN, J.R.V. ; SOARES, A.M.V.M AND GUILHERMINO, L. 2007. Biochemical Responses of the Marine Mussel *Mytilus galloprovincialis* to Petrochemical Environmental Contamination along the North-western Coast of Portugal. *Chemosphere*. 66, 1230-1242.

HABIG, W.H. ; PABST, J.M AND JAKOBY, W.B. 1974. Glutathione S-Transferase. The first step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 249, No.22, pp. 7130-7139.

GADELHA, J.R. ; VIEIRA, L ; HUMANES, M. ; GUILHERMINO, L. ; SOARES, A.M.V.M. & MORGADO, F. 2007 A. DETECÇÃO DA ACTIVIDADE DAS COLINESTERASES COMO BIOMARCADORES AMBIENTAIS EM *Anemonia sulcata* (Forskål, 1775) NA COSTA PORTUGUESA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. (in press).

HASSPIELER BM, BEHAR JV, DI GIULIO RT. 1994. Glutathione dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 28: 82–90.

LENARTOVA, V., HOLOVSKA, K., PEDRAJAS, J.R., MARTINEZ LARA, E., PEINADO, J., LOPEZ-BAREA, J., ROSIVAL, I., KOSUTH, P., 1997. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. *Biomarkers* 2, 247–252.

LIMA, I. ; MOREIRA, S.M. ; OSTEN, J.R.V. ; SOARES, A.M.V.M AND GUILHERMINO, L. 2007. Biochemical Responses of the Marine Mussel *Mytilus galloprovincialis* to Petrochemical Environmental Contamination along the

North-western Coast of Portugal. Chemosphere. 66, 1230-1242.

MONTEIRO, M.; QUINTANEIRO, C.; NOGUEIRA, A.J.A.; MORGADO, F.; SOARES, A.M.V.M AND GUILHERMINO, L. 2007. Impact of Chemical Exposure on the Fish *Pomatoschistus microps* (Krøyer, 1838) in Estuaries of the Portuguese Northwest Coast. Chemosphere. 66, 514-522.

MOREIRA, S.M., GUILHERMINO, L., 2005. The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest Portuguese coast. Environ. Monit. Assess. 105, 309–325.

MOREIRA, S.M., MOREIRA DOS SANTOS, M., RIBEIRO, R., GUILHERMINO, L., 2004. The ‘Coral Bulker’ fuel oil spill on the North coast of Portugal: spatial and temporal biomarker responses in *Mytilus galloprovincialis*. Ecotoxicology 13, 619–630.

NOVAK, V AND SKET, D. 1973. Partial purification of a toxin from tentacles of the sea anemone *Anemonia sulcata* in CANKAR, G AND LEBEZ, D. 2002. Toxicon. Vol. 11. Issue5, 411-417.

SANCHEZ, J.; BRUHN, T.; ANEIROS, A.; WACHTER, E AND BÉRESS, L. 1996. A Simple Biochemical Method in the Search for Bioactive Polypeptides in a Sea Anemone (*Anemonia sulcata*). Toxicon. Vol. 34. No. 11/12, 1361-1366.

VAN DES OOST, R; BEYER, J & VERMEULEN, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology. Vol. 13. 57-149.



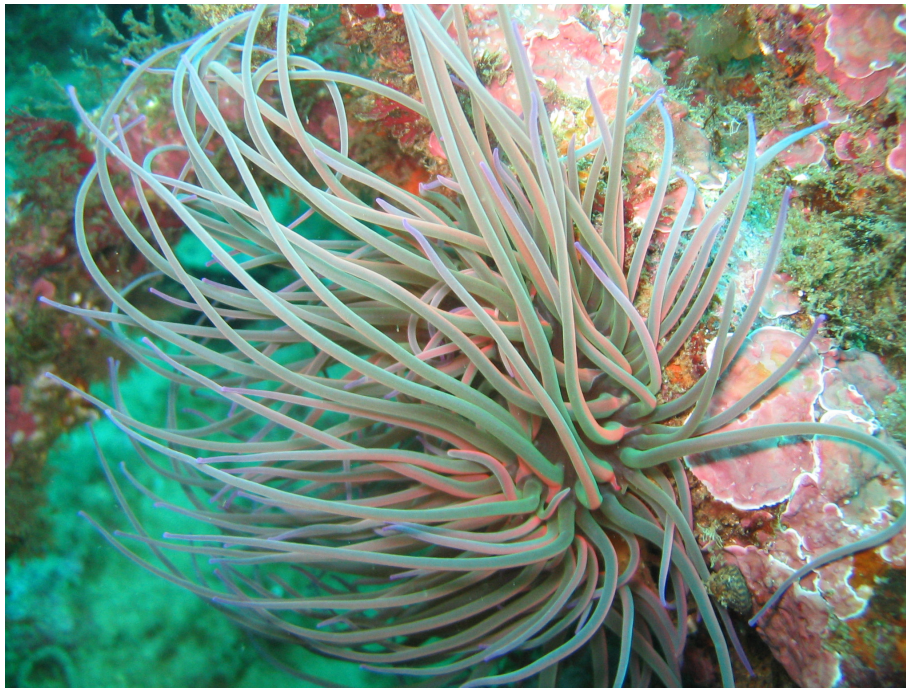


Figura 1. *Anemonia sulcata* espécie escolhida para o estudo da actividades da GST (Glutathione S-transferase).



Figura 2. Áreas de amostragem da Costa Portuguesa (Norte- Praia de Viana do Castelo; Intermédia- Praia da Aguda; Sul- Praia do Tonel, Sagres.)

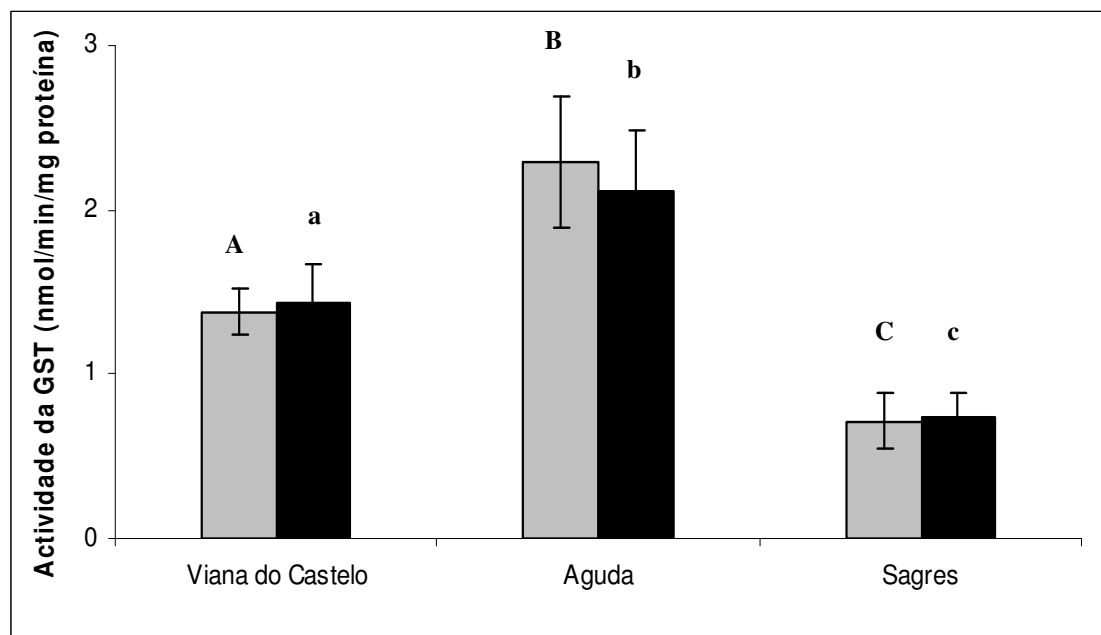


Figura 3. Parâmetros bioquímicos analisados em amostras de *Anemonia sulcata* coletadas de 3 áreas de amostragens ao longo da costa Portuguesa. São apresentados valores médios  $\pm$  desvio padrão ( $n = 7$ ) da actividade de GST ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ ). Letras diferentes identificam diferenças significativas entre locais de amostragem, através do teste Tukey (honestly significant difference multiple-comparison test  $p \leq 0.05$ ). Letras minúsculas indicaram diferenças nos tecidos do tentáculo (a,b,c) e letras maiúsculas indicaram diferenças no pedúnculo (A, B,C).